

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA

FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE CIENCIAS, TECNOLOGÍA E
INGENIERÍA DE ALIMENTOS**



“OBTENCIÓN DE ZUMO DE MEMBRILLO (*Cydonia vulgaris*) MEDIANTE EL TRATAMIENTO ENZIMÁTICO CON POLIGALACTURONASA Y BIOPECTINASE LM”

TESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO DE:

INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

Rosa Inés Zegarra Aliaga

Tingo María - Perú

2000



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA
Tingo María
FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

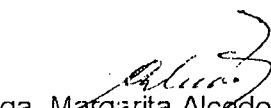
ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los Miembros del Jurado que suscriben, reunidos en acto público el martes 27 de marzo del 2001, a horas 5:00 pm., en la Sala de Grados de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, ubicada en la ciudad de Tingo María, provincia de Leoncio Prado, departamento de Huánuco; para calificar la tesis presentada por el Bachiller en Ciencias Industrias Alimentarias: **Rosa Inés ZEGARRA ALIAGA.**

**“Obtención de zumo de membrillo (*Cydonia vulgaris*)
mediante el tratamiento enzimático con
Poligalacturonasa y Biopectinase L.M”**


Después de haber escuchado la sustentación, las respuestas a las preguntas formuladas, la declaran aprobada con el calificativo de **Muy Bueno**, en consecuencia la Bachiller: **Rosa Inés ZEGARRA ALIAGA**, queda apta para recibir el título de **Ingeniero en Industrias Alimentarias** del Consejo Universitario, de conformidad con el Art.22° de la Ley Universitaria 23733; los artículos 43° y 45° del Estatuto y los artículos 95° y 96° del Reglamento General de la Universidad Nacional Agraria de la Selva.

Tingo María, abril 02 del 2001


Blga. Margarita Alcedo Romero
Presidente




Blgo. Julio Giraldo Huayta
Vocal


Ing. Pedro Peláez Sánchez
Asesor

NICOLAS BESADA G.
NOTARIO PUBLICO

TINGO MARIA

Carmen B.

LEGALIZO la autenticidad de esta copia fotostática, previa confrontación con su original que fué devuelta a parte interesada.

TINGO MARIA, 10 APR 2001

DEDICATORIA

A Dios, por guiarme bondadosamente desde lo más alto de su gloria

A mis padres Eurípides y Civila, por haberme dado la vida y haber forjado en mí una persona de bien

A mis hermanos: Rita, Olimber, Williams, Tarcisio, Enrique, Maritza, Octavio, Mabel y Estéla, quienes también contribuyeron decididamente en mi formación personal y profesional

A Inocente, compañero ideal, por su invaluable apoyo durante mi formación profesional y el desarrollo de este trabajo

A Atiana, cuya llegada a este mundo colmó de felicidad mi hogar

AGRADECIMIENTOS

Al Ing. MSc Pedro Pelaez Sánchez, Asesor de esta tesis, por haber calado y plasmado sus conocimientos en mi persona. Excelente profesional, de quien capté su metodología laboral

A los señores docentes de la Facultad de Industrias Alimentarias, por haberme brindado sus conocimientos y experiencias e inculcado en mi, valores para consolidar mi formación académica y mi ulterior desenvolvimiento profesional

A los técnicos en laboratorio, señores Zózimo Pujay, Concepción Ariza, Quinto Estelo y Celedonio Yacha, por haberme apoyado durante el desarrollo de las pruebas experimentales

A mis compañeros, amigos y demás personas que de una u otra manera han contribuido para la culminación de este trabajo

INDICE GENERAL

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA	3
A. GENERALIDADES DEL MEMBRILLO	3
1. Origen	2
2. Clasificación botánica	3
3. Características botánicas	4
4. Especies y variedades cultivadas	5
5. Producción de membrillo en el Perú	5
6. Estructura y composición química del membrillo	6
7. Cosecha, comercialización y usos	10
8. Obtención del desecho industrial del membrillo	13
B. ENZIMAS	13
1. Definición	13
2. Clasificación de las enzimas de los alimentos	15
3. Principales enzimas que intervienen en el procesamiento de frutas y vegetales	18
4. Factores que afectan la actividad enzimática	24
5. Cinética enzimática	27
C. ELABORACIÓN DEL ZUMO	28
1. Definición	28
2. Requisitos generales	29

3. Operaciones en la elaboración de zumos	29
4. Envases de vidrio	31
5. Tipos de tapa	31
D. ASPECTOS REOLOGICOS DE PULPA Y ZUMOS DE FRUTA	32
1. Reología	32
2. Viscosidad	33
3. Tipos de fluidos alimenticios	33
4. Aproximación de Power Law	35
III. MATERIALES Y METODOS	37
A. MATERIA PRIMA E INSUMOS	37
1. Materia prima	37
2. Enzimas	37
a. Poligalacturonasa (PG)	37
b. Biopectinasa LM	37
B. EQUIPOS , MATERIALES Y REACTIVOS	38
1. Equipos de Laboratorio	38
2. Materiales de Laboratorio	39
3. Reactivos y soluciones	40
4. Envases	41
C. MÉTODOS DE ANÁLISIS	41
1. Índices de madurez y caracterización del membrillo	41
2. Determinación de la actividad enzimática	42
a. Actividad de la Poligalacturonasa PG	42
b. Actividad de la Pectinlías PL	44

c. Actividad de la Pectinesterasa PE	46
d. Actividad de la Celulasa	47
3. Obtención del zumo	49
4. Viscosidad de la pulpa y del zumo	49
5. Caracterización del zumo y almacenamiento	49
D. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	50
1. Evaluación de los índices de madurez y caracterización del membrillo	50
2. Determinación de la actividad enzimática	51
3. Obtención del zumo	51
4. Aspectos reológicos de la pulpa y del zumo	56
5. Características del zumo y almacenamiento.	56
E. DISEÑO EXPERIMENTAL	57
1. Tratamiento enzimático de la pulpa con Poligalacturonasa (PG)	57
2. Tratamiento enzimático de la pulpa con Biopectinasa LM	58
F. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	60
IV. RESULTADOS Y DISCUSION	62
A. INDICES DE MADUREZ Y CARACTERIZACIÓN DEL	62
MEMBRILLO	
1. Índice de madurez.	62
2. Características del membrillo.	63
a. Características biométricas.	63
b. Análisis químico proximal	65
c. Análisis físico – químico de la pulpa de membrillo	66

B. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	67
1. Actividad enzimática de la Poligalacturonasa	67
2. Actividad enzimática de la Biopectinasa LM.	68
C. OBTENCIÓN DE ZUMO	73
1. Acondicionamiento de la pulpa	73
2. Tratamiento enzimático de la pulpa de membrillo	75
a. Tratamiento enzimático con Poligalacturonasa	75
b. Tratamiento enzimático con Biopectinasa.	81
3. Diagrama de flujo , balance de materia y rendimiento	87
D. VISCOSIDAD DE LA PÚLPA Y DEL ZUMO	92
E. CARACTERIZACIÓN DEL ZUMO Y ALMACENAMIENTO	98
1. Análisis físico químico	98
2. Análisis microbiológico	102
3. Análisis sensorial	104
V. CONCLUSIONES	107
VI. RECOMENDACIONES	108
VII. BIBLIOGRAFÍA	109
VIII. ANEXOS	116
Anexo B	117
Anexo C	124
Anexo D	128
Anexo E	132

INDICE DE CUADROS

CUADROS	Pág.
1 Producción anual de membrillo según región, período 1994-1998	7
2 Composición química del membrillo (Por 100 gr de pulpa)	9
3 Grado de madurez del membrillo	62
4 Características biométricas del fruto de membrillo	64
5 Determinaciones porcentual de las fracciones del fruto	65
6 Resultados del análisis químico proximal de la pulpa de membrillo	65
7 Características físico químicas de la pulpa de membrillo	66
8 Rendimiento de zumo extraído por acción enzimática de Poligalacturonasa	76
9 Análisis de varianza de rendimiento de zumo extraído por Poligalacturonasa	77
10 Promedios ordenados de la prueba de Tuckey al 5% por Poligalacturonasa	78
11 Rendimiento de zumo de membrillo empleando diferente tiempo de tratamiento con Poligalacturonasa	80
12 Rendimiento de zumo extraído por acción enzimática de Biopectinasa	82
13 Análisis de varianza del rendimiento del zumo extraído por acción de Biopectinasa	83
14 Promedios ordenados de la prueba de Tuckey al 5% del rendimiento del zumo extraído por acción de Biopectinasa	83
15 Rendimiento de zumo de membrillo empleando diferente tiempo de tratamiento con Biopectinasa	84
16 Balance de material y rendimiento por operación durante la obtención	89

	de zumo de membrillo con Poligalacturonasa	
17	Balance de material y rendimiento por operación durante la obtención de zumo de membrillo con Biopectinasa	91
18	Análisis físico químico de zumo de membrillo obtenido con Poligalacturonasa Durante el almacenamiento	100
19	Análisis físico químico de zumo de membrillo obtenido con Biopectinasa Durante el almacenamiento	101
20	Análisis microbiológico del zumo de membrillo obtenido con Poligalacturonasa y Biopectinasa durante el almacenamiento	103
21	Resultados de la evaluación sensorial del zumo de membrillo y obtenido con Poligalacturonasa y almacenada	105
22	Resultados de la evaluación sensorial del zumo de membrillo y obtenido con Biopectinasa y almacenada	106

INDICE DE FIGURAS

FIGURAS	Pág.
1. Estructura del membrillo	8
2. El uso del membrillo en la industria	12
3. Diagrama de flujo de la preparación de la materia prima para la obtención de pectina de los desechos	14
4. Comparación de las actividades endo y exo Poligalacturonasa	20
5. Flujograma para el acondicionamiento de la pulpa de membrillo	53
6. Flujograma definitivo para la obtención de zumo de membrillo mediante hidrólisis enzimática de la pulpa	55
7. Diagrama experimental para el tratamiento enzimático de la pulpa de membrillo	59
8. Actividad enzimática de la Poligalacturonasa	68
9. Actividad enzimática (PG) de la Biopectinasa	69
10. Actividad enzimática de la (PL) en Biopectinasa	70
11. Actividad enzimática de la (PE) en Biopectinasa	71
12. Actividad enzimática de celulasa en Biopectinasa	73
13. Flujograma para el acondicionamiento de la pulpa de membrillo	74
14. Flujograma de bloques para la obtención de zumo de membrillo, mediante hidrólisis enzimática con Poligalacturoansa	88
15. Flujograma de bloques para la obtención de zumo de membrillo, mediante hidrólisis enzimática con Biopectinasa	90

16. Variación de viscosidad de la pulpa de membrillo por acción de la Poligalacturonasa	93
17. Diagrama reológico de la pulpa de membrillo antes y después del tratamiento enzimático	94
18. Variación de la viscosidad durante el tratamiento enzimático con Biopectinasa	96
19. Diagrama reológico de la pulpa de membrillo antes y después con Biopectinasa	97

RESUMEN

Este trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Análisis de Alimentos de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, Tingo María, utilizándose como materia prima la pulpa del fruto de membrillo (*Cydonia vulgaris*), cuya finalidad fue la elaboración de zumo utilizando la enzima Poligalacturonasa y la enzima comercial Biopectinasa LM, usados para el tratamiento enzimático con el fin de facilitar la extracción del zumo.

Se determinó que la Poligalacturonasa tenía una actividad enzimática de 374.44 U/ml a 30° C y pH 5.0, utilizando el método Iodimétrico; la Biopectinasa LM, presentó actividad pectinolítica y celulolítica (PG 390.72 U/ml, PE 32.86 UPE/ml, PL 21.29 UPL/ml y celulosa 9.25^{-3} U/ml).

Se hidrolizó la pulpa con cada una de las enzimas y luego de obtener el zumo se cuantificó los rendimientos. El mejor resultado con Poligalacturonasa se obtuvo al hidrolizar la pulpa con 0.03 % , 50° C/30 minutos con lo cual se logró un rendimiento de 82.03 %; y el mejor resultado con Biopectinasa se obtuvo al hidrolizar la pulpa acondicionada con 0.01 % , a 50°C/ 60 minutos con lo cual se logró un rendimiento de 82.04 %.

La pulpa fue evaluada reológicamente antes y después del tratamiento enzimático, caracterizándose por ser un fluido que presentó un comportamiento Pseudoplástico con pérdida de índice de consistencia (m); variando estos valores entre 2.0186 Pa.sⁿ y 1.4834 Pa.sⁿ para la PG y de 2.2216 Pa.sⁿ y 1.8377 Pa.sⁿ para la Biopectinasa.

El zumo fue envasado y almacenado por 90 días, no presentando cambios significativos en sus características físico químicas y microbiológicas siendo más estable el almacenado en refrigeración (8 ° C) que a temperatura ambiente.

En el análisis sensorial, el zumo fue calificado como bueno en sabor y aroma; color amarillo claro; turbidez: amarillo claro traslúcido ligeramente perceptible a 620 nm.

SUMMARY

The present research was made at the Food Analysis Laboratory of the university: Universidad Nacional Agraria de la Selva, Tingo María, Perú. It was using as raw material pulp of quince fruit (*Cydonia vulgaris*) with its objective to elaborate quince juice using the enzyme Poligalacturonasa and commercial enzyme Biopectinasa LM, used for the enzymatic treatment in order to ease the extraction of quince juice.

Using an iodimetric method it was found that poly galacturonase had an enzymatic activity of 374.44 U/ml at 30° C and pH 5.0, using the method Iodimétrico; the Biopectinasa LM, presented activity pectinolítica and celulolítica (PG 390.72 U/ml, PE 32.86 UPE/ml, PL 21.29 UPL/ml and cellulose 9.25-3 U/ml).

It was hydrate the pulp with each enzymes and after obtaining the juice it was quantified the yields, the best result with poly galacturonase was obtained by hydrate the pulp with 0.03%, 50° C/30 minutes with that which a yield of 82.03% was achieved; and the best result with Biopectinasa was obtained by hydrolyzing the pulp conditioned with 0.01%, at 50°C / 60 minutes with that which a yield of 82.04% was achieved.

The pulp was evaluated rheologically before and after the enzymatic treatment being characterized to be a fluid that presented a pseudo plastic behavior with loss of consistency index (m); carrying these values between 2.0186 Pa.sⁿ and 1.4834 Pa.sⁿ for PG and 2.2216 Pa.sⁿ and 1.8377 Pa.sⁿ for the Biopectinasa.

The juice was packed and stored by 90 days, not presenting significant changes in its chemical physical and microbiology characteristics being more stable the one stored in refrigeration (8 ° C) than to ambient temperature.

The sensorial analysis showed that quince juice was qualified as good in flavor and aroma as good, clear yellow color; turbidity: light perception translucent clear yellow to 620 nm.

I. INTRODUCCIÓN

En las regiones de la costa y sierra de nuestro país, existen frutas poco estudiadas pero que presentan atributos importantes que ameritan ser investigados para luego recomendar su industrialización posterior. Algunos de estos frutales se adaptan con gran facilidad a condiciones poco hospitalarias para su crecimiento y desarrollo, son tolerantes a plagas y enfermedades y producen una buena calidad de fruto, tal es el caso del membrillo (*Cydonia vulgaris*), que es una baya de características especiales al que también se le conoce con el nombre de “poma”, cuyo fruto adquiere diferentes formas de acuerdo a su variedad y crece espontáneamente en forma de bosques silvestres cultivándose incluso en huertos.

Los frutos del membrillo (*Cydonia vulgaris*) son de tamaño regular y ricos en pulpa, lo que posibilita su industrialización con el fin de añadirle mayor valor agregado. La obtención de zumo es una alternativa para otorgarle mejores oportunidades para su comercialización.

En el procesamiento de zumos existen dificultades tales como el exceso de agentes enturbiantes, bajos rendimientos de extracción e inestabilidad en el producto final entre otros, incrementando dichas dificultades los costos de producción.

Sin embargo, un tratamiento de hidrólisis enzimática conduciría a definir una tecnología que nos permita optimizar la utilización de la pulpa, para lo cual se considera el empleo de enzimas pectolíticas (Poligalacturonasa y Biopectinasa LM)

En esta investigación se ha planteado los siguientes objetivos:

- Caracterización del índice de madurez de pulpa de membrillo y, determinación de la actividad enzimática y el efecto de la enzima Poligalacturonasa y Biopectinasa LM en

el rendimiento de la extracción de zumo

- Determinar los parámetros del tratamiento enzimático óptimo para la obtención del zumo
- Caracterización físico-química, microbiológica y sensorial del zumo durante el almacenamiento

La investigación se desarrollo en el período comprendido entre abril de 1998 y marzo de 1999.

II. REVISION BIBLIOGRAFICA

A. GENERALIDADES SOBRE EL MEMBRILLO

1. Origen

Según Tamaro (1936), citado por Neyra (1976), el membrillo es una planta indígena de Europa Meridional. En la actualidad se encuentra en estado silvestre en la isla de creta, en los bosques del Cáucaso (regiones meridionales y en la Anatolia), así como también en el norte de Persia.

Se sostiene que el membrillo fue traído al Perú conjuntamente con otras frutas por los conquistadores, adaptándose en nuestro medio en forma magnífica, obteniéndose frutales de calidad superior a los producidos en España. Tamaro (1936), hace mención a las zonas de Lunahuaná, Moquegua y Cuzco por los excelentes membrillos que producían.

2. Clasificación botánica.

Su clasificación botánica es la siguiente:

DIVISIÓN	:	Embriofita
SUB DIVISIÓN	:	Tracheophita
CLASE	:	Pteroside
SUB CLASE	:	Dicotiledónea
ORDEN	:	Rosales
FAMILIA	:	Rosaceae
SUB FAMILIA	:	Pomoideae
GENERO	:	<u>Cydonia</u>
ESPECIE	:	<u>Cydonia oblonga.</u>

No obstante que también aparece en la bibliografía como Cydonia vulgaris, en el país se le conoce a la especie como Cydonia oblonga.

3. Características botánicas

El membrillero es un frutal caducifolio, al igual que el manzano y otros, con la ventaja de tener mucho menor requerimiento de frío que éstos.

Tamaro (1936); Soler (1961), señalan que tierras apropiadas para el peral lo son igualmente para el membrillero; agregan que es poco exigente respecto a las condiciones del suelo, con tal de que ésta no sea ácida ni cretáceo.

En nuestro país, el membrillero prospera en buenas condiciones desde el nivel del mar hasta 2,800 m. de altitud, con inclinación por los climas cálidos.

El fruto es una baya de carácter especial que recibe el nombre de “pomo” y adquiere formas distintas de acuerdo a la variedad. Dentro de las variedades criollas nacionales, el membrillero “Lucumo” tiene una forma algo achatada, el “Blanco”, en cambio, es por lo general periforme. El tamaño que alcanzan las frutas en el país es muy variable; van de 8 a 15 cm de largo y de 6 a 12 cm de diámetro. Su peso varía entre 200 a 700 gr.

Entre las variedades extranjeras, el “Gigante de Lescowatz” es el que tiene el fruto de mayor tamaño, llegando a pesar hasta 1,500 gr (Muñoz , 1976).

El fruto recién formado es de color verde oscuro, cuando ha alcanzado su madurez fisiológica adquiere exteriormente la coloración amarilla o verdosa dependiendo de la variedad. Algunas variedades despiden un perfume muy pronunciado y agradable.

La parte comestible es gruesa y carnosa, pudiendo ser blanca o amarilla, de acuerdo a la variedad. Las semillas se encuentran interiormente distribuidas en 5 celdas con

8 ó 15 semillas por celda, dispuestas en doble fila y circundadas por una sustancia mucilaginosa y pegajosa.

4. Especies y variedades cultivadas

Según Tamaro (1936), se cultivan tres especies de membrillo:

Cydonia vulgaris Pers

Cydonia sinensis Thouin

Cydonia japónica Pers

Es el *Cydonia vulgaris* Pers, la especie típica y silvestre que ha originado todas las variedades cultivadas. Las otras dos especies se cultivan mayormente con fines ornamentales.

Soler (1961), concuerda con Tamaro en lo que se refiere a las especies cultivadas y enumera las siguientes variedades: Manning Seedling, Champión, Smyrna, Van Diemen, Early Golden, De Angers, Mammuth Gigante de Lesccowatz. Como apta para la exportación recomienda las variedades: Champión, De Angers y Mammuth.

En el Perú existen sólo dos selecciones cultivadas comercialmente Morin , et al, (1969): “Blanco” y “Lucumo”. La selección “Blanco”, llamada así por el color de su parte comestible, es la más cultivada en el país con más del 90 % de las plantaciones totales y esta selección, según Morin (1969) es la más apta para la industria. La selección “Lúcumo”, llamada así por el color semejante a la lúcuma de su parte comestible se ubica en segundo lugar. Su producción se debe destinar al consumo en fresco.

5. Producción de membrillo en el Perú.

En nuestro país existen poblaciones de plantas en sin número de jardines, huertas mixtas de frutas, etc. a lo largo de la costa y de la sierra.

En la costa tenemos los departamentos de la Libertad, Ancash, Lima, Ica, Arequipa, Moquegua y Tacna. En la sierra: Cuzco, Apurímac, Ayacucho, Huancayo, Ancash y Cajamarca (Estadística Agraria del Ministerio de Agricultura, 1994 – 1998).

Comercialmente, los departamentos que revisten importancia en cuanto a este cultivo son: Lima, Arequipa y Ancash. En el departamento de Lima están ubicadas más del 80 % de las plantaciones, siendo las provincias de mayor importancia: Huarochirí, Cañete y Chancay. Huarochirí se constituye en la zona membrillera de mayor importancia en el país, específicamente en la quebrada alta del río Lurín.

Cabe señalar que a pesar del alto rendimiento que tiene este cultivo, que según la estadística Agraria del Ministerio de Agricultura es de 8,147 kg/ha, y de 6,856 kg/Ha. Para los años de 1994 y 1998, respectivamente, se mantiene su producción, no obstante, en un estado estacionario, como se aprecia en el Cuadro 1. Esto debido, principalmente, a la falta de una explotación organizada que incluye un control sobre plagas y enfermedades, un mejoramiento de los sistemas de cosecha y comercialización y a que la producción casi en su totalidad se consume en estado fresco no habiendo, hasta la fecha 1999, plantas industriales que se dediquen a la obtención de nuevos productos de membrillo, que absorban los excedentes de su producción y que incentiven de esta forma se desarrolle, desde el estado estacionario actual en que se encuentra.

6. Estructura y composición química del membrillo

El membrillo es una fruta que en la actualidad ha sido extensamente estudiada, por innumerables autores, dando como resultado que se conozca en forma certera su estructura, su ciclo vegetativo, sus requerimientos como cultivo, etc., y además factores que afectan a la obtención de una buena cosecha.

Cuadro 1. Producción anual de membrillo según región, periodo 1994–1998 (En TM)

REGION	1994	1995	1996	1997	1998
TOTAL NACIONAL	5,874	5463	5728	5920	3702
1. Grau	-	-	-	-	-
2. Nor Oriente	120	131	113	96	54
3. La Libertad	78	79	94	172	225
4. Chavin	478	471	116	125	125
5. Lima	3,725	3257	4241	4331	2227
6. Libertadores wari	270	287	310	435	240
7. Arequipa	308	406	335	324	313
8. José C. Mariategui	816	760	434	355	38
9. Inca	79	72	85	82	11
10. Ucayali	-	-	-	-	-
11. Andres. A Caceres	-	-	-	-	-
12. San Martín	-	-	-	-	-
13. Loreto	-	-	-	-	-

Fuente: Direcciones regionales y subregionales de Agricultura MINAG-OIA. (1994 – 1998)

a. Estructura del membrillo

La estructura de una fruta de membrillo es bastante simple, presenta externamente una capa o piel que puede ser de color verde o amarilla, después continúa la parte comestible que varía entre los colores amarillo y blanco, dependiendo de la variedad.

En el interior se encuentran las semillas, distribuidas en cinco celdas con un promedio de 12 semillas por celda, dispuestas en doble fila y circundadas por una sustancia mucilaginosa y pegajosa.

La estructura del membrillo se presenta en la Figura 1. que aparece en la siguiente pagina

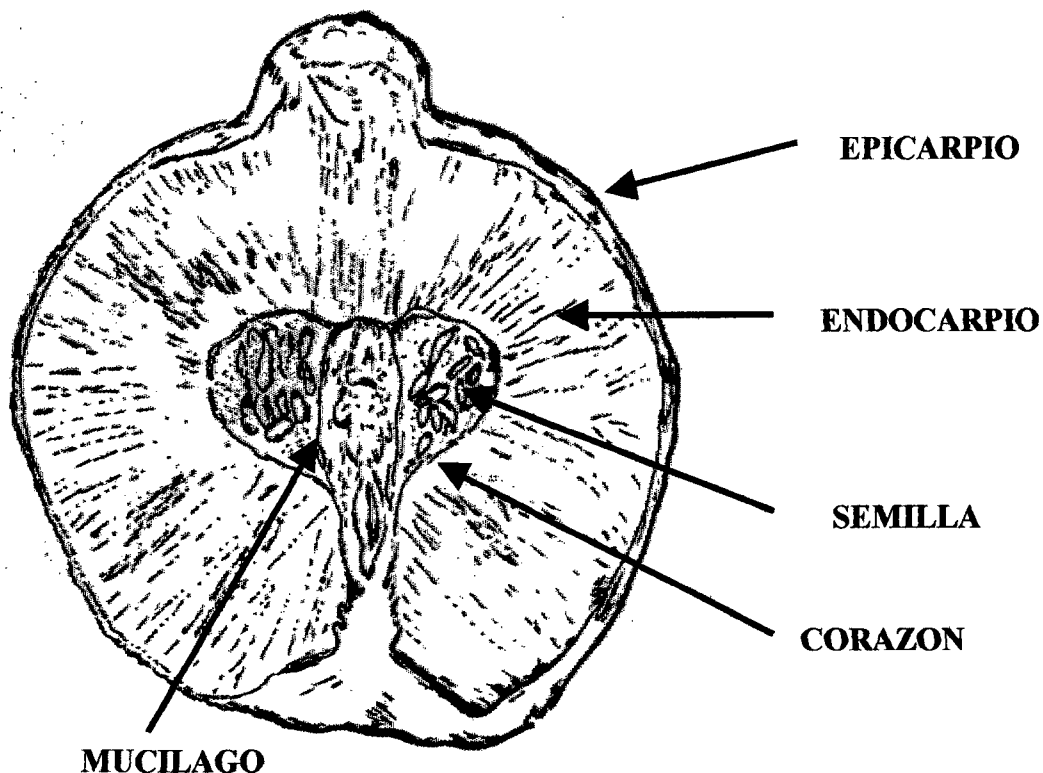


Figura 1. Estructura del membrillo (*Cydonia vulgaris*)

Fuente: Muñoz, (1967)

b. Composición química del membrillo.

Si bien el membrillo no es una fruta excepcional desde el punto de vista nutricional, sin embargo, se encuentra dentro del promedio de las frutas, según se aprecia en el Cuadro 2. Comparándola con frutas que tienen un consumo relativo, como son las manzanas y las peras, tiene un valor alimenticio mayor que ellas, así por ejemplo: el membrillo tiene 29 y 12.5 mg/100 gr de fósforo y vitamina C respectivamente, mientras que las manzanas tienen 11 y 1.3 y la pera 6 y 2.5 (Instituto Nacional de nutrición, 1969).

Tamaro (1936), nos manifiesta que en España se utiliza en la medicina, debido a sus propiedades astringentes, tónicas y estomáticas.

Al poseer un elevado contenido de pectina y un pH bajo (3.1) se presta para su industrialización en mermeladas, machacado, purés, néctares y conservas en general, debido a que no es necesario el agregado adicional de pectina ni de ácidos reguladores del pH. En su procesamiento (Neyra 1976).

Joslyn y Tressler (1961), por su parte nos indican que el membrillo tiene un contenido de azúcares reductores de 9.1 %, acidez de 1.2 % (expresado como ácido málico), cenizas 0.36 %, proteína 0.30 % y humedad de 89.04 %.

Cuadro 2. Composición química del membrillo (*Cydonia vulgaris*), por 100 gramos de pulpa

CONSTITUYENTE	UND	* A	*B
Humedad	gr.	82.4	86.9
Proteína	gr	0.6	0.3
Grasa	gr	0.3	0.1
Carbohidratos	gr	16.3	11.5
Fibra	gr	2.2	1.3
Ceniza	gr	0.4	1.2
Vitamina A	mg	10.0	-
Tiamina	mg	0.03	0.06
Riboflavina	mg	0.03	0.02
Niacina	mg.	0.04	0.23
Vitamina C	mg	17.0	12.5
Calcio	mg	6.0	9.0
Fósforo	mg	15.0	29.0
Fierro	mg	0.6	0.7
Valor energético (calorías)		63	43

Fuente: * A Tabla de composición de alimentos para América Latina (FAO, 1961)

* B Composición de los alimentos Peruanos (Collazos, et al, 1975)

7. Cosecha, comercialización y usos.

La selección criolla de membrillo empieza a producir a los 3 ó 4 años, alcanzando su máxima producción a los 10 ó 12 años.

La cosecha es bastante sencilla y se realiza cuando la fruta ha alcanzado su tamaño y coloración propias de la variedad y despiden un perfume muy pronunciado y agradable. Se realiza retirando la fruta de la planta por una ligera torsión hacia arriba y dejando caer la fruta al suelo sufriendo golpes y magulladuras debido a que su cáscara es muy delgada, produciéndose enmarronamientos superficiales, por lo cual es muy común ver en los mercados fruta de baja presentación y con principios de contaminación microbiana.

Marin y Muñoz (1969), recomiendan el uso de tijeras cosechadoras así como de bolsas cosechadoras especiales como las utilizadas en la cosecha de cítricos. Estas bolsas constan de una especie de saco que puede hacerse de diversos materiales, aunque, generalmente es de lona por su mayor duración.

Su uso ofrece las siguientes ventajas:

- Permite acelerar la operación de cosecha.
- Dar mayor trato a la fruta
- Dar comodidad al cosechador.

Para el transporte del campo al lugar de embalaje se usan costales de yute, cajones o alforjas de tela.

Para el transporte a los mercados de consumo es embalada en cajones de listones de madera o “jabas”, los mismos que no son adecuadamente diseñados de manera que las frutas sufran abolladuras, especialmente las que van en la parte superior debido a un excesivo llenado.

El membrillo a pesar de ser una fruta ampliamente conocida por la mayoría de los consumidores, sin embargo, su consumo anual per cápita es limitado, muy inferior a otros frutos.

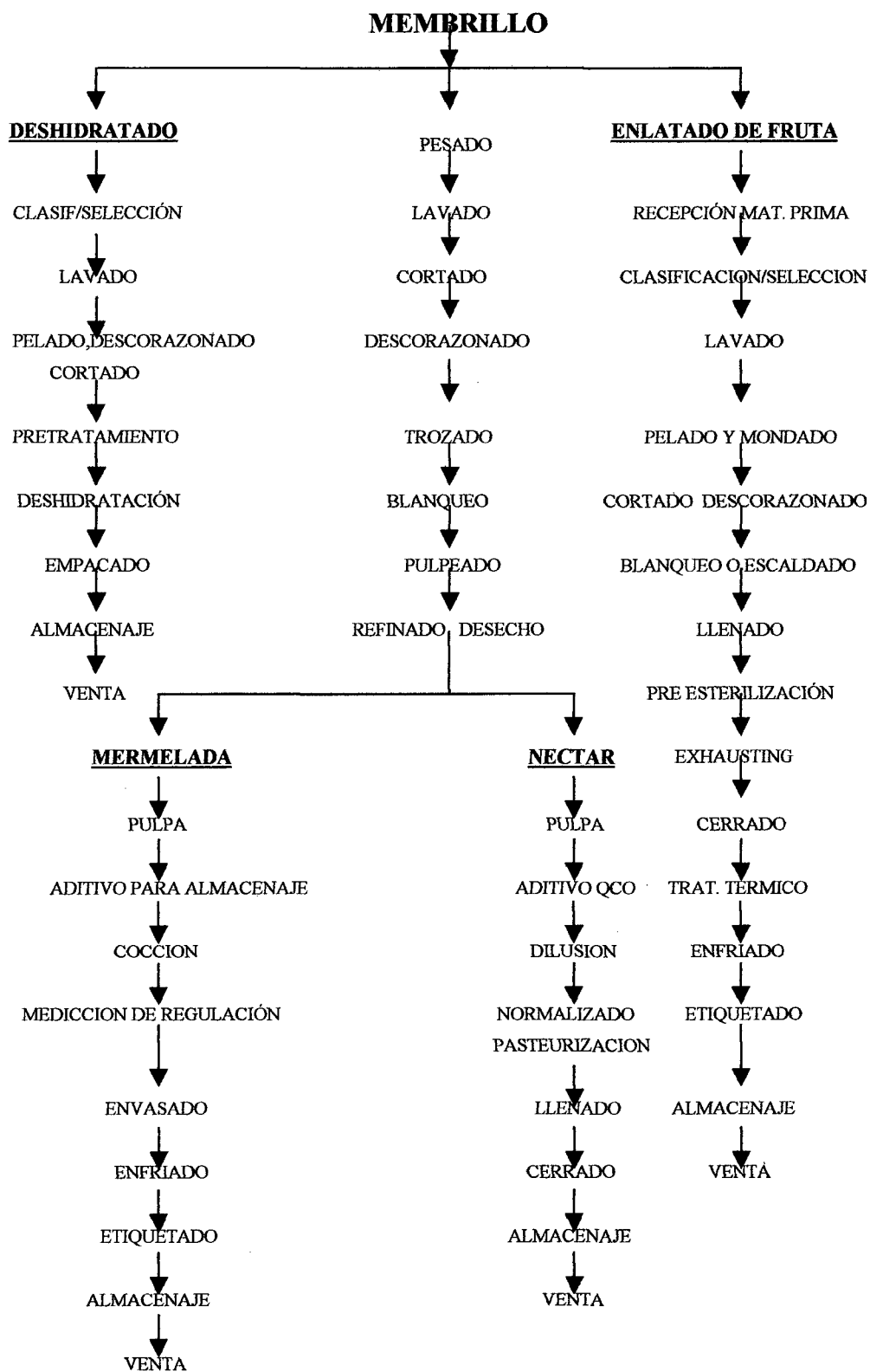
El mayor centro de consumo en el país es Lima, llegando al mercado mayorista casi la totalidad de la producción proveniente de las provincias cercanas a la capital durante todo el año, siendo la época de mayor producción de Enero a Mayo, en la que hay bajas en su precio por el incremento de la oferta.

Referente a sus usos, Childers (1949), indica que en Estados Unidos se utiliza en la preparación de gelatina, mermeladas, conservas y otros productos similares, también para dar un sabor particular a manzanas y peras cuando son cocidas o procesadas; asimismo, Tamaro (1936), menciona su uso en la preparación de sorbetes, compotas y licores de mesa.

En nuestro país la cantidad de membrillo absorbida por la industria es significativamente baja en comparación con los estimados de fruta fresca, su uso industrial está limitado solo a la producción de mermeladas, machacado y en pastelería para la preparación de alfajores (king – kong), las que se realizan a escala doméstica.

En la actualidad esta fruta aún no está industrializada, ya que a ese nivel solamente se elaboran productos como: néctares, mermeladas, machacado y deshidratado de membrillo, y en un futuro cercano, para completar la industrialización integral de esta fruta, pectinas, gomas y colorantes.

En la Figura 2 se puede apreciar los diferentes usos que se les puede dar al fruto del membrillo, con indicación de las secuencias de operaciones para la elaboración de cada producto



FUENTE: Neyra, 1976.

Figura 2. El uso del membrillo en la industria

8. Obtención del desecho industrial del membrillo

Entre una de las posibles aplicaciones y usos de los desechos provenientes de la industrialización del membrillo en la producción, sobre todo, de néctares y mermeladas, se encuentra la extracción de pectinas. La preparación de este desecho para encontrarse listo a la extracción de pectinas se muestra en la Figura 3.

B. ENZIMAS

1. DEFINICION

Las enzimas son catalizadores biológicos de naturaleza proteica que regulan muchas reacciones que tienen lugar en los seres vivos (Berrueta et al, 1992).

Jagnow (1991), menciona que en su estructura existe entre otras cosas, un centro activo más o menos específico, gracias al cual se catalizan determinadas transformaciones biológicas.

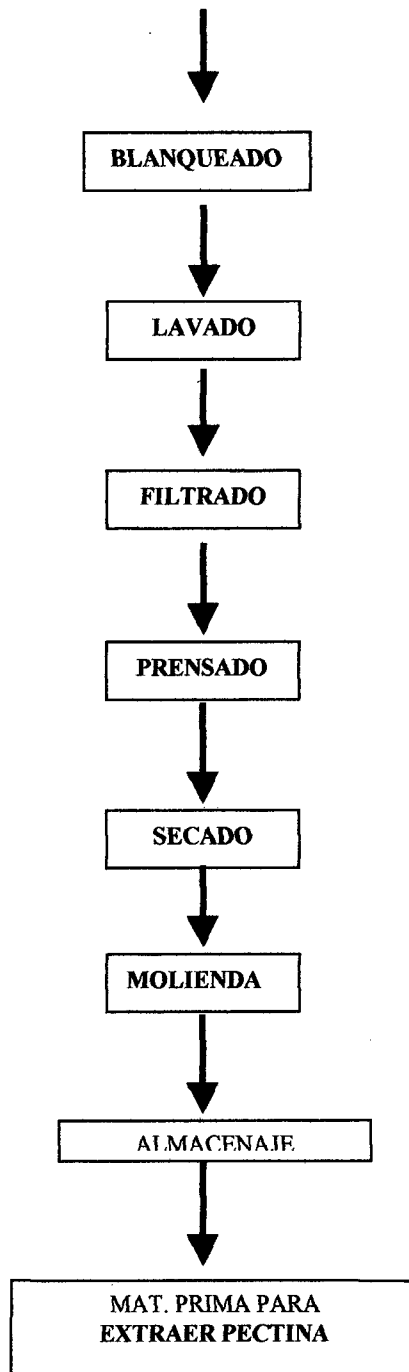
Con el conocimiento de la naturaleza y con la disponibilidad industrial de las enzimas se han extendido ampliamente los campos de aplicación: industrias alimentarias, medicina y sanidad, industria química, etc (Berrueta et al, 1992).

La industria alimentaria constituye hoy en día el más amplio campo de aplicaciones de los procesos enzimáticos, con excepción del uso de enzimas (como las proteasas alcalinas) en la industria de los detergentes (Wissemann, 1986).

Las razones más importantes para la utilización de enzimas en la transformación de productos destinados a la alimentación son los efectos físico – químicos u organolépticos de su acción sobre los mismos:

- Disminución de la viscosidad

DESECHO INDUSTRIAL



Fuente: Royo Iranzo, et al, 1975

Figura 3. Diagrama de flujo de la preparación de la materia prima para la obtención de pectina de los desechos industriales del membrillo

- Mejora de filtrabilidad
- Disminución de la tendencia a la cristalización
- Clarificación y estabilización de líquidos con vistas a conservación
- Insolubilización de macromoléculas por formación de coágulos.
- Mejora la fermentabilidad.
- Mejora la digestibilidad
- Mejora la textura y características organolépticas.
- Aumenta el poder edulcorante.

Se puede decir, que las enzimas son aditivos autorizados en la alimentación humana, siendo reconocidos como inocuos (GRAS – Generally Recognized As Safe) (Wisseman, 1986).

2. CLASIFICACIÓN DE LAS ENZIMAS DE LOS ALIMENTOS.

Braverman (1980), distingue dos importantes grupos de enzimas de los alimentos: Hidrolasas y las desmolasas o enzimas oxidantes.

1. HIDROLASAS.

Comprende las siguientes:

a. Esterasas. Entre las cuales son de importancia en los alimentos:

- **Lipasas**, que hidrolizan los ésteres de ácidos grasos
- **Fosfatasas**, que hidrolizan los ésteres fosfóricos de muchos compuestos orgánicos, como por ejemplo, glicerofosfatos, almidones fosforilados:
- **Clorofilasas**. En la industria alimentaria debe tratarse de retener el color verde de la clorofila, en el caso de los vegetales deshidratados o en conservas. Por ello puede protegerse el color natural (retención de clorofila de hasta el 60%) por los siguientes tratamientos:

- Pretratamiento por inmersión (ejemplo arvejas), a temperatura ambiente, en solución de bicarbonato de sodio al 2 % por espacio de 30 a 40 minutos
- Escaldado en solución de hidróxido de calcio 0.005M
- Procesamiento en salmuera, que lleva adicionada hidróxido de magnesio (0.020 – 0.025M)

El pH en estos casos se eleva a 8 en el primer tiempo y se mantiene durante el escaldado y la esterilización posterior

- **Pectino-sterasa**, enzima importante en la industria de derivados de frutas.

b. Carbohidrasas, que se clasifican en:

- **Hexosidasas**, entre las que intervienen la invertasa y la lactasa.
- **Poliasas**, que comprende las amilasas, las celulasas y la poligalacturonasa o pectinasa, que actúa sobre el ácido péctico o poligalacturónico, dando moléculas de ácido galacturónico, carentes de poder gelificante; de importancia en la elaboración de zumos y néctares de frutas.

c. Proteasas, que se clasifican en:

- **Proteinazas**, endoenzimas que rompen las uniones peptídicas: CO-NH de las proteínas, algunas de las cuales son muy resistentes al ataque de la enzima proteolítica, en su estado nativo; por el calor u otros agentes se puede abrir la molécula proteica, de modo que entonces las uniones peptídicas pueden ser atacadas por estas enzimas.
- **Peptidasas**, que rompen las uniones de los péptidos hasta la liberación

final de moléculas de aminoácidos

- **Catepsinas**, a cuya acción en el músculo proteico se deben los procesos autolíticos en la maduración de la carne. El tejido vivo tiene un pH desfavorable para la acción de estas enzimas, pero a la muerte del animal baja el pH al acumularse ácido láctico por degradación del glicógeno. Al alcanzar un pH 4.5 se hace óptimo para la liberación y acción de la enzima, apareciendo los respectivos cambios en la textura y demás caracteres de la carne.
- **Renina, quimosina o fermento lab.** Que se encuentra en el cuarto estómago del ternero alimentado sólo con leche materna y que causa la coagulación de la leche.

2. DESMOLASAS O ENZIMAS OXIDANTES.

Entre ellas son de interés en alimentos:

a. Oxidasas, que comprenden:

- **Las oxidasas férricas:**
- **Peroxidasa**, que se encuentra en verduras y frutas cítricas, su estudio es de gran interés en la industria de los alimentos por ser una de las enzimas más estables al calor y requerir mayor tiempo de inactivación, con el agravante de que en ciertas condiciones puede regenerar su actividad con el tiempo.
- **A las oxidasas cúpricas**, pertenecen la polifenol-oxidasa, tirosinasa, catecolasa, relacionadas con el pardeamiento enzimático y la ascórbico-oxidasa.

b. Dehidrogenasas

- **Xantino-oxidasa**, que es una flavoproteína con molibdeno y cataliza la oxidación de xantina y aldehídos como el fórmico, actuando como aceptor de H el azul de metileno, al transformarse en su leuco-derivado; en esto se basa su aplicación analítica en el control térmico de la leche y en la detección de leche de vaca en leche humana, pues esta última no contiene esta enzima.
- **Lipoxidasa**, que cataliza la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados y secundariamente también al caroteno de frutas y verduras deshidratadas, a través de los peróxidos formados.

3. PRINCIPALES ENZIMAS QUE INTERVIENEN EN EL PROCESAMIENTO DE FRUTAS Y VEGETALES**a. Enzimas pecticas o pectinasas**

El término pectinasas o enzimas pectolíticas concierne sólo a las enzimas que degradan la parte galacturónicas de estas sustancias: comprende dos grupos, aquéllas que desesterifican los residuos metilados del ácido galacturónico y aquéllos que degradan los enlaces α (1-4) entre los residuos de dicho ácido.

La mayor parte de las preparaciones pectolíticas comerciales son obtenida a partir de cultivos en superficie o sumergidos de *aspergillus niger*. Estas contienen, en proporción variable, endopoligalacturonasa, exopoligalacturonasa, pectinestereasa y endopectinliasa. Las pectinas de alto grado de metilación pueden ser degradados de dos maneras: en primer lugar por desesterificación en presencia de pectinestereasa seguida de hidrólisis por la

poligalacturonasa, y en segundo lugar por transeeliminación en presencia de pectinliasa.

La **pectinesterasa o pectin-metil-esterasa (PE)**, desesterifica las pectinas liberando metanol y formando pectatos. Las enzimas despolimerizantes se clasifican según el sustrato preferencial, su modo de acción y la naturaleza de la reacción catalizada.

De acuerdo con estos criterios son cinco los tipos de enzimas pectolíticas despolimerizantes conocidos: **Endo y exo - poligalacturonasas** que hidrolizan preferencialmente el ácido péctico y la pectina de bajo grado de metilación (LM); **endo y exo_pectatoliasas** que catalizan reacciones β _eliminación preferencialmente sobre el ácido péctico, y las **endopectinliasas** que catalizan reacciones de β _eliminación preferencialmente sobre las pectinas LM y HM (Schmidt y Penacchiotti, 1982; Badui, 1984).

1) POLIGALACTURONASA (PG).

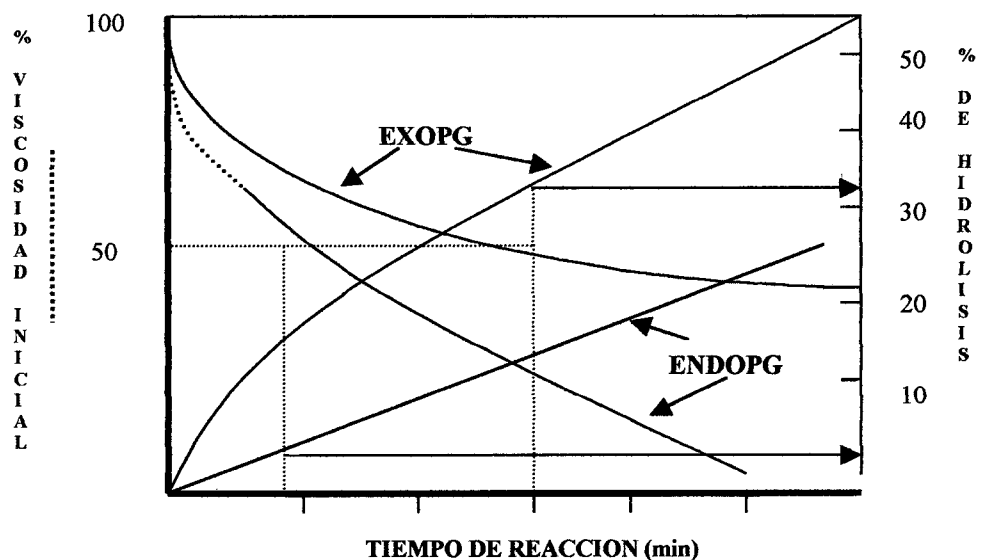
Las poligalacturonasas (EC.3.2.1.15 y EC.3.2.1.67) son producidas por diversos microorganismos como bacterias (*Pseudomonas sp.*), hongos (*Aspergillus sp.*) y levaduras (*Saccharomyces marxianus*) Estas enzimas se encuentran también en las frutas, pero en cantidades muy pequeñas comparadas con la producción de microorganismos.

La acción de poligalacturonasas sobre el ácido péctico, provoca de una parte, la aparición en cantidad creciente de grupos reductores y de otra parte una disminución progresiva de la viscosidad. La determinación del aumento del poder reductor y la medida de la disminución de la viscosidad son dos métodos utilizados para determinar la actividad poligalacturonasa. Las

determinaciones viscosimétricas no son recomendables para actividades exopoligalacturonasas.

Las endopoligalacturonasas ocasionan una disminución rápida de la viscosidad de las soluciones de ácido péctico; una reducción de 50 % atañe 0,3 a 10 % de uniones hidrolizadas. En el caso de la exopoligalacturonasas esta disminución de 50 % en la viscosidad implica de 30 a 40 % de hidrólisis Figura 4.

El pH óptimo de actividad se sitúa entre 4 y 5; la temperatura óptima varía entre 45 y 50° C (Braverman, 1980 ; Badui, 1984; Fennema, 1993).



Fuente: Campos, G. B. 1993.

Figura 4. Comparación de las actividades endo y exo poligalacturonasa

2) PECTINESTEREASAS (PE)

Las pectinesteresas (EC.3.1.1.11) son producidas por microorganismos, especialmente hongos y bacteria, sus sustratos preferenciales son los pectatos, de acuerdo a su modo de acción.

Las pectinesterasas provenientes de vegetales tienen un pH óptimo de actividad entre 6,6 y 8,0; mientras que en aquellos provenientes de hongos el pH óptimo de actividad varía entre 3,5 y 4,5.

Esta enzima produce la hidrólisis de la pectina formando ácido péctico o poligalacturónico y metanol; al actuar de preferencia sobre los enlaces metílicos, vecinos de grupos carboxílicos libres (Schmidt_Hebbel y Pennacchiotti, 1982).

Como estas enzimas son las causantes de la pérdida de las características de turbidez de algunos jugos y néctares, deben inactivarse por el calor. Para así conservar el cuerpo o textura del concentrado. Como estabilizadores de turbidez de jugos y néctares de frutas cítricas suele agregarse a la vez pectinasa y una proteasa vegetal (papaína, bromelina), la cual contribuye a aumentar el desdoblamiento del pectato de calcio.

En cambio, una adición de preparados a base de pectinoesterasas, muchas veces en mezcla con celulasas y pectinasa (0.05 – 0.5g/l.) llamados “enzimas filtrantes o clarificantes”, al degradar las sustancias pécticas, permiten realizar filtraciones rápidas para obtener jugos claros sin obstruir los poros del filtro y evitando a la vez cambios de los jugos por fenómenos de oxidación en las filtraciones lentas. Esta enzima también es aplicada antes de la operación del prensado del jugo con la finalidad de lograr un mayor rendimiento en jugo, en algunas frutas que no se pueden prensar con facilidad (Schmidt _hebbel y Pennacchiotti, 1982).

3) PECTINLIASAS (PL).

Las Pectinliasas (EC.4.2.2.10) son producidas principalmente por hongos

(*A. Niger*) y excepcionalmente por bacterias (*pseudomonas sp.*, *E. Carotovora* y *E. Areoidea*). Las pectinliasas conocidas actualmente tienen un tipo de acción endo, lo cual indica que la ruptura de los enlaces glucosídicos α - (1- 4) de los residuos de metilgalacturonato está catalizado por las endopectinliasas. El modo de acción de esta enzima implica la transeeliminación de un protón del átomo de carbono 5 de un residuo urónico y la ruptura simultánea del enlace glucosílico adyacente. Debido a la producción de un $\Delta - 4,5 -$ urónido insaturado.

El sustrato es degradado por β -eliminación. Estas enzimas degradan preferencialmente las pectinas de alto grado de metilación. A medida que el grado de metilación de la pectina aumenta, la afinidad de la enzima por esta disminuye (k_m aumenta): sin embargo la velocidad máxima (V_m) no se modifica.

Las endopectinliasas son las únicas enzimas que despolimerizan las pectinas de alto grado de metilación. Las poligalacturonasas y las pectatoliasas requieren una desesterificación previa de la pectina, sea por vía química o por acción de la pectinesterasa (Braverman, 1980; Fennema, 1993; Crueger y Crueger, 1993).

b. Celulasas (EC. 3.2.1.4)

Hidrolizan los enlaces β (1- 4) glucano de la cadena de celulosa y de sus productos de degradación dando como molécula final la glucosa. La celulosa no es una enzima aislada, sino un sistema enzimático que posee por lo menos tres actividades. El componente C_1 de los sistemas celulolíticos que aún no ha

podido ser perfectamente determinado. β (1 - 4) glucanasas, llamadas con anterioridad celulasas C_x ; en este grupo se encuentran las exoglucanasas que separan sucesivamente unidades de azúcar empezando por el extremo reductor de la cadena de β (1 - 4) glucano, y las de tipo endo que actúan indiscriminadamente sobre los enlaces glicosídicos β (1 - 4) de la cadena. La tercera acción diferenciable en un sistema celulolítico la celobiosa por lo que se le denomina β (1 - 4) dimerasa o celobiasa.

El pH óptimo de los sistemas celulolíticos varía entre 4 y 6. Son termoestables y la temperatura óptima para cada uno de ellos se encuentra alrededor de 60°C. Se trata por lo tanto, de parámetros favorables a la aplicación técnica. Los preparados de celulasa tienen las siguientes aplicaciones: Extracción de los componentes del té verde, modificación de los alimentos vegetales, elaboración de extractos vegetales y aumento de la flexibilidad del papel.

La mejor fuente de obtención de preparados técnicos, capaces de atacar la celulosa cristalina, es el hongo *Trichoderma viride* (Crueger y Crueger, 1993; Braverman, 1980 ; Fennema,1993).

c. Hemicelulasas

Las hemicelulasas agrupan un gran número de enzimas (xilanasas, glucanasas, arabanasas, galactanasas, entre otras) que degradan algunos constituyentes de las paredes celulares como: xilanos complejos heteropolisacáridos extremadamente ramificados a los que se unen por covalencia los ácidos galacturónicos del ácido péctico (Meurens, 1979).

Las aplicaciones en la industria alimentaria son principalmente en la solubilización de las pentosanas del endospermo de trigo para mejorar las calidades de panificación de ciertas harinas. La despolimerización enzimática de β glucanos de cebada con el fin de disminuir la viscosidad de los mostos de la cerveza y facilitar la filtración y en los procesos de extracción de té y café (Braverman, 1980 ; Badui, 1984; Campos, 1993).

d. Amilasas

El grupo de enzimas que degradan el almidón dextrinas está formado por α y β - amilasas, amiloglucosidasas y las enzimas desramificantes (pululanasas e isoamilasas). Durante el procesamiento de algunas frutas como: manzana, pera y plátano, es necesario recurrir a una hidrólisis del almidón; para esto se debe utilizar la o las enzimas que por sus características resulten adecuadas para estos procesos. Dados las condiciones en el procesamiento de estas frutas, pH (4.0 – 4.5) y temperatura (50 – 55°C), es que se refiere utilizar amiloglucosidasa de origen fúngico (Campos, 1993).

4. FACTORES QUE AFECTAN LA ACTIVIDAD ENZIMATICA

Hay numerosos factores que afectan la actividad enzimática, estos tienen que ver con el uso de la enzima. Entre las más importantes tenemos:

a. Efecto de la temperatura.

La temperatura óptima para la mayoría de las reacciones enzimáticas está, con pocas excepciones entre 30 y 40 ° C, donde la actividad es máxima. Al aumentar la temperatura, la velocidad de reacción aumenta y, para casi todas las enzimas, un incremento de 10°C duplica e incluso triplica la velocidad de

reacción. Por otro lado, sin embargo, ese mismo aumento de temperatura acelera también la inactivación de la enzima por desnaturalización térmica.

Las enzimas muestran, a menudo, una marcada fragilidad térmica. Cuando se calientan a temperaturas superiores a 50°C, la mayoría de las enzimas, pero no todas, se desnaturalizan y unas pocas muestran desnaturalización cuando se enfrían aproximadamente a 5 °C.

La mayoría de las enzimas son termolábiles siendo habitualmente suficiente aplicar una temperatura de 40 a 80 ° C por 2 a 5 minutos a fin de destruir su actividad (Schmidt_Hebbel y Pennacchiotti, 1982).

b. Efecto de las radiaciones

Las enzimas se afectan también por irradiaciones con ondas electromagnéticas. La inactivación por luz ultravioleta se debería a la fotólisis de grupos disulfuro y aromáticos de los aminoácidos que constituyen las proteínas. Estos efectos sobre las enzimas son de escaso rendimiento, por lo que la luz ultravioleta no es de aplicación práctica, desde este punto de vista, en la tecnología alimentaria (Schimidt_Hebbel y Pennacchiotti, 1982).

c. Efecto de la humedad

La disponibilidad de agua, medida como actividad del agua, tiene una fuerte influencia sobre la velocidad de las reacciones por enzimas, es decir, la actividad enzimática aumenta al aumentar el contenido de “agua libre” y ello ocurre no sólo en las reacciones hidrolíticas, en las que el agua es uno de los reactantes obvios, sino también en las reacciones no_hidrolíticas (Schmidt_Hebbel y Pennacchiotti, 1982).

d. Efecto del pH y del estado iónico.

La actividad enzimática guarda también relación con el estado iónico de la molécula y, especialmente, de la parte proteica, puesto que las cadenas polipeptídicas contienen grupos que pueden ionizarse en un grado que depende del pH existente. El pH óptimo de las enzimas varía ampliamente. Sin embargo, la gran mayoría de las enzimas tienen un óptimo entre 4 y 8.

Algunas enzimas muestran una amplia tolerancia a los cambios del pH, pero otras trabajan bien sólo en un rango estrecho. Cualquier enzima que se someta a valores extremos de pH, se desnaturaliza (Schmidt_Hebbel y Pennacchiotti, 1982).

e. Sitio activo y especificidad enzimática.

Algunas enzimas tienen una especificidad prácticamente absoluta para un determinado sustrato y no atacarán ni siquiera a moléculas muy relacionadas. Por ejemplo, la enzima aspartasa cataliza la adición reversible de amoníaco al doble enlace del ácido fumárico, pero a ningún otro ácido no saturado. En el otro extremo están las enzimas que tienen una especificidad relativamente amplia y actúan sobre muchos compuestos que presentan una característica común.

Dos características estructurales determinan la especificidad de una enzima por su sustrato según (Schmidt_Hebbel y Pennacchiotti, 1982).

- El sustrato debe poseer el enlace químico específico o unión, que puede ser atacado por la enzima, y
- El sustrato debe poseer habitualmente algún otro grupo funcional, un grupo de unión, que se une a la enzima y ubica en posición a la molécula de

sustrato de modo que el enlace susceptible se disponga apropiadamente en relación al sitio activo de la enzima.

5. CINETICA ENZIMATICA.

El objetivo de la cinética enzimática es el estudio de las enzima en su funcionamiento. Se propone en particular, establecer las reacciones que existen entre la velocidad de la reacción enzimática y las concentraciones del sustrato [S] y de la enzima [E], así como la influencia de algunos factores: pH, temperatura, presencia de efectores y eventualmente actividad de agua (Scriban, 1985).

A una concentración de enzima constante [E], la velocidad de la reacción catalizada por la enzima se incrementa conforme aumenta la concentración de sustrato [S], hasta llegar a una velocidad máxima (V_m). Esto es debido a la saturación del sitio activo de la enzima con la formación de un complejo enzima_sustrato [ES], la cual es una etapa esencial en la formación del producto [P] (Atkinson, 1985).

a. Actividad enzimática.

Un gran problema para los enzimólogos es cuantificar la actividad o concentración de una enzima, la única manera para detectar la actividad enzimática es evaluando lo que hace sobre su sustrato específico. Por tanto la única forma de medición de la actividad o cantidad de una enzima, es por determinaciones en los cambios en su sustrato bajo condiciones controladas (Furia, 1972).

Hay numerosas formas de expresar los resultados de los ensayos enzimáticos. La comisión sobre enzimas a definido una unidad internacional de la actividad enzimática, el Katal; cantidad de enzima que transforma un mol de sustrato por segundo bajo las condiciones experimentales estándar (Scriban, 1985).

Medición de la actividad enzimática.

Existe una serie de procedimientos con los cuales medir la actividad pectinasa en términos de unidades no directamente relacionados a números de enlaces rotos.

- a) La pérdida de viscosidad de pectinas de alto peso molecular o ácidos pécticos es bastante común entre las pruebas sensibles de medición para determinar las enzimas endo que atacan estos sustratos.
- b) Los polimeros neutrales de azúcar cercanamente asociados con la rhamnogalacturonana son las galatanas y arabanas. La actividad de las galactanasas es generalmente estimada por análisis de los grupos de reducción y procedimientos cromatográficos (Fuchs, Knee y Friend; Van Teten y Bateman; Mullen; citados por Heiteffus).
- c) Existe una extensa metodología para medir enzimas depolimerizadas. Desde que todas las enzimas pécticas producen grupos reductores sobre el sustrato hidrolizado, muchas de las pruebas de medición están basadas en la determinación de estos grupos. Entre otros, para la estimación de grupos reductores se ha usado la técnica del ácido dinitrosalicílico.

C. ELABORACION DE ZUMO

1. DEFINICION

El zumo de fruta es el liquido obtenido de la extracción de las frutas, no diluido, no concentrado, no fermentado y sometido a un tratamiento adecuado para asegurar su conservación en envases herméticos (INDECOPI, 1976).

2. REQUISITOS GENERALES.

El zumo deberá ser extraído, en condiciones sanitarias, de frutas maduras, fresca, sanas, limpias, cuidadosamente lavadas y libres de restos de insecticidas, fungicidas y otras sustancias eventualmente nocivas. Podrá llevar en suspensión pulpa del fruto finamente dividida. Deberá estar exento de trozos de corteza, semilla y fragmentos gruesos y duros.

No se permitirá la adición de sustancias que modifiquen la naturaleza del zumo, salvo, lo estrictamente necesario de azúcar refinado o ácido cítrico para ajustar la relación de sólidos solubles y acidez titulable, cuando así lo autorice la norma correspondiente; ácido ascórbico como antioxidante y vitaminas como enriquecimiento. Se fijará en cada caso la acidez titulable máxima, no se permitirá la adición de colorantes artificiales (INDECOPI, 1976).

3. OPERACIONES EN LA ELABORACION DE ZUMOS

En el procesamiento de zumo se debe seguir las siguientes operaciones:

Tratamientos preliminares.

Preparación de la fruta, en primer lugar las frutas son sometidas a selección, lavado, calibrado, inspección, acondicionamiento, según modalidades y aparatos adaptados a cada caso.

Extracción de zumos.

Los zumos de frutas se extraen por diversos métodos, según la estructura de la fruta, su composición química y los caracteres que se deseen conseguir para la bebida, como por ejemplo: transparencia, viscosidad, astringencia más o menos grande. Es común utilizar en esta operación la trituración y el tamizado.

El triturado de la fruta puede ser llevado a cabo en forma mecánica en molinos

especiales para frutas. El rendimiento en zumos de las frutas puede ser incrementado por tratamiento con enzimas pectinolíticas (maceración digestiva, especialmente indicadas en bayas y drupas) (Belitz, 1988; Chefftel, 1980).

La licuefacción del tejido de las frutas con enzimas pectinolíticas y celulolíticas, ofrecen nuevas perspectivas; las cuales son particularmente indicadas para las frutas blandas y/o tropicales, y en las que, siguiendo el esquema preparación, lavado, triturado, licuefacción, filtración, pasteurización, llenado sin adición de agua, se llega directamente a la obtención de zumos listos para su consumo.

Clarificación

Se emplea para la preparación de zumos claros, facilitando la separación de partículas responsables de la turbidez, también asegura la estabilización tratando de evitar la aparición de nuevas turbideces.

Filtración

Se emplea con la finalidad de conseguir total brillantes; exclusivamente para la terminación de los zumos para ello se debe adoptar una asepsia rigurosa y un filtrado a través de materiales porosos (asbestos, celulosa, tierra de diatomeas) o por centrifugación.

Desaireación

Se realiza haciendo pasar el zumo en un recipiente bajo vacío para eliminar el gas disuelto; naturalmente conviene recordar que no tiene interés desairear zumos de frutas si al mismo tiempo no se toman medidas para evitar la reincorporación del aire. Así mismo, no deben desairearse zumos que puedan perder su aroma natural.

Pasteurización.

El método más utilizado para conservación de zumos es el tratamiento térmico,

cuyo pH es inferior a cuatro, este efecto es fácil de alcanzar, solo se necesita eliminar a las levaduras, mohos y algunas bacteria lácticas y acéticas. El tratamiento térmico manteniendo a una temperatura escogida durante un tiempo determinado conduce a la muerte de los microorganismos e inactivación de la enzima que puedan alterar el producto y hacerlo inapropiada para el consumo humano. En el caso de zumos de frutas, cuyo pH es normalmente inferior de 4,0, este efecto es fácil de alcanzar (Belitz, 1988).

Llenado en caliente y autopasteurización

Consiste en someter al zumo de fruta a una pasteurización relámpago y enfriarlo inmediatamente hasta 82 a 85°C, para introducirlo a los envases (previamente calentados si son de vidrio) a esta temperatura (Chefftel, 1980; Belitz, 1988).

4. ENVASES DE VIDRIO

El vidrio es un silicato complejo compuesto esencialmente de sílice (SiO_2), óxido de sodio (Na_2O) y óxido de calcio (CaO); el vidrio a pesar de su consistencia, no es una sustancia sólida, sino un líquido de viscosidad muy elevada, su fluidez varía con la temperatura sin discontinuidad y no se observa ni punto de fusión, ni punto de solidificación (estado vitrio).

Desde el punto de vista químico, el vidrio es inerte a la temperatura ordinaria frente a los productos alimenticios acuosos o lipídicos y a los diversos ácidos orgánicos que pueden existir en forma natural en los alimentos.

Otra propiedad del vidrio llamado “blanco”, es la transparencia, ventaja muy considerable para la presentación de algunos productos (Chefftel, 1980).

5. TIPOS DE TAPAS

Existen innumerables tipos de cápsulas y tapas, cada uno adaptado a determinado

sistema de apertura o boca. Fundamentalmente las primeras materias que se utilizaron fue la hojalata, chapa negra, aluminio y diversos “materiales plásticos”, presentados bajo la forma de tapones flexibles o bien rígidos.

A esta cápsula se le denomina el “tapón corona” y es el más generalizado para las botellas; se coloca por presión y apretado del metal bajo el bordillo (abultamiento) de la boca (Chefftel, 1980).

D. ASPECTOS REOLOGICOS DE PULPAS Y ZUMOS DE FRUTAS

1. REOLOGIA

Es la ciencia de la deformación de la materia, se ocupa preferentemente de la deformación de los cuerpos aparentemente continuos y coherentes, pero con frecuencia trata también de la fricción entre sólidos, del flujo de polvos, e incluso de la reducción a partículas, o molturación.

a. Justificación de los estudios reológicos.

Existen cuatro razones fundamentales para justificar el estudio del comportamiento reológico de los cuerpos. En primer lugar, contribuye al conocimiento de su estructura; por ejemplo existe cierta relación entre el tamaño y forma molecular de las sustancias en disolución y su viscosidad, así como entre el grado de entrecruzamiento de los polímeros y su elasticidad. En segundo lugar, en la industria se efectúan con frecuencia medidas reológicas sobre las materias primas y los productos en elaboración que son de gran utilidad para el control de los procesos; como por ejemplo, cabe citar el control reológico de la masa durante la fabricación del pan. En tercer lugar, la reología presta una valiosa ayuda al diseño de máquinas; es preciso que tolvas, tuberías

y bombas se adecuen a las características de los productos con los que van a ser utilizados y finalmente, sus características reológicas influyen de un modo considerable en la aceptación de un producto.

b. Dificultades de las valoraciones reológicas.

Existen dos obstáculos esenciales: El primero está constituido por la enorme diversidad de materiales existentes y el segundo deriva del distinto comportamiento que cualquier producto ofrece al variar las condiciones en que se observa (Muller, 1973).

2. VISCOSIDAD.

La viscosidad es la propiedad de un fluido que da lugar a fuerzas que se oponen al movimiento relativo de capas adyacentes en el fluido. Estas fuerzas viscosas se originan entre las moléculas del fluido y son de carácter similar a las fuerzas cortantes de los sólidos (Geankoplis, 1995).

3. TIPOS DE FLUIDOS ALIMENTICIOS

Los fluidos alimenticios pueden clasificarse en tiempos independientes y tiempos dependientes (Steffe, 1992). Por otra parte se agrupa a los fluidos alimenticios en función a la ley de Newton de la viscosidad en Newtonianos y no Newtonianos (Osorio, 1990).

En los fluidos tiempo independiente el esfuerzo cortante no es función del tiempo o duración de la acción cortante. Entre estos fluidos tenemos:

Fluido Newtoniano

Fluido pseudoplástico

Fluido dilatante

Fluido plástico de Bingham

Fluido pseudoplástico con umbral de fluencia

Fluido dilatante con umbral de fluencia (Barboza, 1993).

a. Fluido newtoniano

Son aquellos fluidos en la que la relación entre el esfuerzo de corte o cizalla y la velocidad de deformación o velocidad de corte siguen una relación lineal Brito, (1995); Osorio, (1990), indica que el modelo matemático que relaciona TAO y gamma es:

$$\tau = \mu (dv/dy)$$

donde:

τ : Esfuerzo de corte o cizalla (Pa)

μ : Viscosidad dinámica o coeficiente de viscosidad (Pa.s)

dv/dy : Gradiente de deformación o velocidad de corte (s^{-1})

Los líquidos simples, pastas con bajo contenidos en sólidos presentan comportamiento ideal newtoniano. En este tipo de flujo se incluye a la mayoría de las bebidas como: té, café, cerveza, leche, aceite, zumo de naranja, zumo de manzana, vinos bebidas gaseosas, etc (Barboza, 1993).

b. Fluido pseudoplástico

Este comportamiento es muy común en fluidos alimenticios. En muchos casos este comportamiento no newtoniano puede ser atribuido a la presencia de sustancias de elevado peso molecular en solución y/o a la dispersión de sólidos en una fase fluida.

Para los fluidos pseudoplásticos el índice de comportamiento de flujo es menor

que la unidad (Brito, 1995).

$$\tau = m (dv/dy)^n$$

donde:

m : Índice de consistencia (Pa.sⁿ)

n : Índice de comportamiento de flujo (n < 1).

c. Fluido dilatante.

Estos fluidos son menos comunes y su comportamiento muestra un aumento de la viscosidad al elevar la velocidad de corte. Para este tipo de fluidos la ecuación de la ley de potencia (Power Law, Ostwald-de walle-Nutting), es este caso el índice de comportamiento de flujo n es mayor que la unidad (Brito, 1995).

d. Fluido Plástico Bingham.

Estos fluidos son los más simples debido a que solo difieren de los newtonianos en cuanto a que la función lineal no pasa por el origen; es decir que para iniciar el flujo se requiere un exceso de cierto valor de esfuerzo de corte (llamado limite de fluidez o esfuerzo de cedencia).

4. APROXIMACIÓN CON ECUACIÓN DE LEY DE POTENCIA (Power law).

La definición de un fluido Power Law produce una ecuación para la velocidad de corte en el disco (spindle) para estos materiales:

$$dv/dy = (2\Omega/ n)[\alpha^{2/n}/\alpha^{2/n} - 1]$$

Con fluidos pseudoplásticos (Shear– Thinning), el índice de comportamiento de flujo puede ser determinado directamente. Considerando la ecuación de la ley de potencia con la ecuación anterior como la expresión para la velocidad de corte nos

da:

$$\tau = m(dv/dy)^n = \Omega^n (m^{1/n} (2/n) [\alpha^{2/n}/\alpha^{2/n} - 1])^n$$

Tomando logaritmo a cada lado, la ecuación anterior puede ser escrita como:

$$\text{Ln } \tau = n \ln (\Omega) + n \ln ((m^{1/n} (2/n) [\alpha^{2/n}/\alpha^{2/n} - 1])^n)$$

La cual, después de evaluar la derivada con respecto a $\text{Ln}\Omega$, proporciona una expresión simple para el índice de comportamiento de flujo:

$$n = d(\text{Ln } \tau) / d \ln (\Omega)$$

Dado que TAO puede ser escrita como:

$$\tau = M / (2\pi h R_b^2)$$

Por lo tanto, para fluidos la ley de potencia, n es la pendiente (como una línea recta) del $\ln (M)$, o $\ln(\text{TAO})$ versus $\ln (\Omega)$. Luego que n es conocido, la ecuación inicial puede ser fácilmente evaluada (Steffe, 1992 ; Peláez, 1998).

III. MATERIALES Y METODOS

El presente trabajo de investigación se desarrolla en los laboratorios de: Análisis de Alimentos, Microbiología de Alimentos y Análisis Sensorial de Alimentos, de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, situada en la ciudad de Tingo María, en el período comprendido entre abril de 1998 y marzo de 1999.

A. MATERIA PRIMA E INSUMOS.

1. MATERIA PRIMA

Para la investigación se utilizaron frutos maduros del membrillo (*Cydonia vulgaris*), los cuales fueron adquiridos en el mercado mayorista de frutas de la ciudad de Lima.

2. ENZIMAS

a. POLIGALACTURONASA (E.C.3.2.1.15)

Se conoce como: Polygalacturonasa; Poly-[1,4, α - D- galacturonide] glycanohidrolase; E.C 3.2.1.15. Una unidad de actividad enzimática de esta enzima libera un micromol de ácido galacturónico, a partir del ácido poligalacturónico por minuto, a pH 4,0 y a 25° C. Se presenta en solución en KCl y sorbitol, presenta 17.8 mg de proteína/ml x 25 unidades Enzima /mg. de proteína y se codifica como P 4716 en la marca SIGMA.

b. BIOPECTINASA LM.

Es una mezcla de enzimas, pectinasas, hemicelulasas y celulasas. Se reporta una actividad enzimática de 30,000 AJDU/ml (Apple Juice Depectinisation Unit).

Tiene una actividad óptima entre 50 – 60°C; su pH óptimo se encuentra en el rango de 3.0-4.5, pudiéndose darse con un rango de trabajo de 2.5 a 5.

Cuando es almacenado por debajo de 15°C, tiene una vida útil de 6 meses. La marca utilizada fue QUEST International.

B. EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS

1. EQUIPOS DE LABORATORIO

Entre los equipos más utilizados en el presente trabajo se tienen:

- Balanza semianalítica, marca Sartorius sensibilidad 0,1 gr. EEUU
- Balanza analítica electrónica-OHAUS Modelos AP 210 serial #113032314, sensibilidad 0,0001 gr EEUU.
- Baño maría THELCO- Precisión Scientific co Chicago 60647 USA. Serie 11-X-4, rango de temperatura de 0° a 100° C.
- Bomba de vacío (precisión Vacuum Pump) Model 535, CGA Corporation USA.
- Cámara congeladora, marca Oliveros.
- Estufa marca Mermet electric tipo LR-202.
- Espectrofotométrico molecular, modelo Espectronic 20, marca Bausch & Lomb. Rango de longitud de 340 a 960 nm.
- Licuadora semi industrial de construcción casera.
- Molino coloidal con rango de molienda de 0,0 a 3,9 m.m tipo M - 10 - 951. Hungría.
- Potenciómetro rango 0 a 14 digital tipo pH Tester USA
- Refrigeradora tipo L - 50 Lehel.
- Refractómetro de mesa, graduado de 0 a 100% de sacarosa tipo ABBE.

- Selladora manual de chapas de construcción casera.
- Viscosímetro capilar Cannon - Fenske, marca KIMAX (USA), viscometer tube N° 100.
- Viscosímetro BROOKFIELD LVT. Brookfield Engineering Laboratories, Inc Soughton, USA.
- Vernier, marca SOLINGER, made in Germany.

2. MATERIAL DE LABORATORIO

- Agitador de vidrio.
- Buretas de 25 y 50 ml. C/u.
- Cronómetro
- Cuchillos de acero inoxidable.
- Embudos de vidrio y porcelana.
- Fiolas de 50, 100, 250, 500 ml. C/u
- Kitasato de 250 ml
- Matraces de 100, 250 ml. C/ u.
- Papel filtro rápido
- Papel filtro Whattman N° 40 - 42.
- Pipetas de 0.25, 1.0, 2, 5, 10 ml. C/u.
- Probetas de 10, 100, 250 ml. C/u
- Pizeta.
- Tela para filtrado (algodón).
- Termómetro graduado (0 - 100 ° C).
- Tubos de prueba.
- Vasos de precipitados de 100, 250, 400, 600 ml. C/u.

3. REACTIVOS Y SOLUCIONES

Todos los reactivos utilizados fueron químicamente puros, y son:

- Acetato de sodio 1M, pH 4.
- Acido acético 1M , pH 4.
- Acido clorhídrico concentrado
- Alcohol etílico al 96% de pureza.
- Acido sulfúrico 2M.
- Almidón soluble 1 %.
- Bisulfito de sodio 0.5 gr.
- 2,6 diclorofenolindofenol.
- 2,4 dinitrofenol.
- Acido ascórbico.
- Acido poligalacturónico, marca SIGMA.
- Hidróxido de sodio 0.1 N.
- Fenol
- Fenolftaleína al 1%.
- Fosfato de potasio dibásico 0.1 M
- Glucosa anhidra.
- Buffer acetato de sodio 0.1 M, pH 4.5
- Buffer acetato de sodio 1 M, pH 5.0
- Buffer de citrato 0.05M y pH 4.5
- Buffer fosfato de potasio dibásico 0.1M con ácido cítrico 0.1M
- Substrato de pectina 0.5% (93% de metilación) marca Sigma
- Solución de Yodo, 0.1 N.

- Solución de pectina al 1% (93% de metilación)
- Tartrato de sodio y potasio
- Tiosulfato de sodio $5H_2O$; 0.1N.

Otros reactivos usados en el análisis químicos y microbiológicos.

4. ENVASES

Se utilizaron botellas de vidrio de 180 ml de capacidad, provistos de sus respectivas tapas.

C. METODOS DE ANALISIS

Los métodos de análisis que se emplearon en el desarrollo del trabajo de investigación se presentan a continuación:

1. INDICES DE MADUREZ Y CARACTERIZACION DEL MEMBRILLO

Se realizaron las siguientes determinaciones analíticas cualitativas y cuantitativas:

a. Determinaciones físicas

- Características biométricas (Shewfelt, 1993).
- Relación de pulpa / cáscara (Shewfelt, 1993).

b. Análisis químico proximal

Se determinó:

- Humedad, método 12.002 (AOAC, 1984).
- Proteína, método semimicro Kjeldahl, utilizado como factor de conversión de nitrógeno a proteína 6.25 (AOAC, 1984).
- Grasa, método 13.074 (AOAC, 1984).
- Fibra bruta, método 962.09 (E.b) (AOAC, 1997).
- Ceniza, método 940.26 (A) (AOAC, 1997).

- Carbohidratos totales, se determinan por diferencia, después de haber realizado los análisis anteriores (Hart Fisher, 1994; AOAC, 1984).

c. Análisis físico químico

- **Viscosidad aparente** método (Steffe, 1992; Mitschka, 1982).
- **PH**; potenciométricamente a 20 ° C; método 11.032 (AOAC, 1984).
- **Sólidos solubles**; método refractométrico (muestras oscuras u opacas) 932.14 © (AOAC, 1997).
- **Sólidos totales**; por diferencia del porcentaje de humedad.
- **Acidez titulable**; método 942.15 (A,a) (AOAC, 1997).
- **Índice de madurez**; cociente de dividir los grados brix por la acidez titulable (Royo, 1977).
- **Vitamina C**; método espectofotométrico propuesto por el Departamento de agricultura de Canadá, 1976.
- **Azúcares Reductores y Totales**; método espectofotométrico de (Miller, 1959).
- **Pectina**; método cuantitativo y cualitativo (Rohm Enzyme, 1978; Rangana, 1979).

2. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA

a. Actividad de la Poligalacturonasa (PG)

Se determinó mediante el método Iodimétrico (Neufeld et. Al. , 1968).

PRINCIPIO

La enzima produce una hidrólisis al azar del ácido poligalacturónico dando origen a una mezcla de ácidos D- galacturónico y Di- galacturónico en una relación molar aproximada de 4:3, a este nivel el 70% de los enlaces del polímero lineal se

encuentran hidrolizados. Se produce una hidrólisis lineal, durante el cual aproximadamente el 25% de los enlaces glucosídicos son hidrolizados después del cual la velocidad de reacción decae.

El ensayo enzimático se basa en la medición de la velocidad inicial del incremento en grupos aldehídos los cuales están relacionados con la oxidación de hipoyodito, durante los primeros 3 - 5% de hidrólisis, también hay un rápido descenso de la viscosidad de la solución del ácido poligalacturónico.

REACTIVOS

Enzima; Se diluyó la enzima en concentraciones convenientes (1/50).

Pectina; conocido como ácido poligalacturónico obtenido de naranja con una pureza de 86%, codificado como P 3889 en la marca SIGMA.

- Na_2CO_3 , 1M.
- Solución de Yodo, 0.1 N
- H_2SO_4 , 2M
- $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$; 0.1 N

PROCEDIMIENTO

Para preparar una solución de poligalacturonato de sodio al 0,5% se siguió los siguientes pasos:

Suspender un gramo de ácido poligalacturónico en 150 ml. de agua destilada, se agregó 20 ml de buffer acetato de sodio 1 M a pH 5,0 se tituló la solución a pH 5,0 con NaOH ,1N y ajustar el volumen a 200 ml. Con agua destilada.

Llevar a 30° C. 20 ml de una solución de ácido poligalacturónico, adicionar 1 ml de la solución de enzima adecuadamente diluida, mezclar rápidamente y anotar el tiempo. Se toman 5 ml de la mezcla en reacción y se le adiciona 5 ml de la

solución de yodo 0.1 N en un frasco erlenmeyer de 50 ml se anota el tiempo en el momento en que se adiciona la solución de yodo a la muestra. Se adiciona 0.9 ml de Na_2CO_3 1 M inmediatamente, la mezcla es dejada en reposo exactamente 20 minutos, luego es acidificada con 2 ml de H_2SO_4 , 2 M y el yodo residual es titulado con $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 0.1 N.

2 ó 3 muestras son tomadas a partir de la mezcla en reacción (aproximadamente cada 4 ó 5 minutos), el tiempo es registrado como en el caso anterior y son tratados similarmente.

Los valores de la titulación son ploteados como una función del tiempo para determinar la pendiente de la recta obtenida.

Un microequivalente de yodo reducido corresponde a 0.513 micromoles de grupos aldeídos liberados Neufeld (1968). La actividad de la enzima es calculada y expresada por ml ó mg de proteína de la solución de enzima.

DEFINICION DE LA UNIDAD ENZIMATICA

La actividad de una enzima endo - polygalacturonasa es la cantidad de enzima que producirá un micromol de grupos aldeídos/ minuto a 30° C y pH 5.0.

Aunque el pH óptimo está entre 4.4 y 4.5 la curva de actividad tiene un pico ancho y la diferencia en la actividad es el desprecio, la ventaja de usar pH 5.0 es que el ácido péctico de alto peso molecular es más soluble a pH 5.0 que en pH 4.0.

b. Actividad de la Pectinlasi (PL)

Se determinó por el método espectrofotometría

PRINCIPIO

El método escogido se basa en la variación de formación de productos urónicos

insaturados 4:5. La conjugación del doble enlace con el carbono C₆ produce un aumento de la absorbancia, máxima a 235 nm de la luz ultravioleta.

REACTIVO

Buffer: Fosfato de potasio dibásico 0.1 M y ácido cítrico 0.1 M, mezclar hasta pH de 5.2

Substrato: Disolver 0.5% de pectina (93% de metilación, marca sigma) en buffer o disolver 0.5% de pectina modificada M en buffer.

Enzima: 1.0 – 10,000 unidades / ml

PROCEDIMIENTO

La reacción se realizó en tubos, donde se colocó 0.1 ml de la solución de enzima adecuadamente diluida en buffer citrato – fosfato ($\mu = 0.3$) al pH deseado, estabilizando la temperatura sobre baño de agua a 25°C. A cada tubo se le agregó 2 ml de sustrato disuelto en buffer y se agitó durante un minuto. La reacción se frenó agregándole 2 ml de H₂SO₄ 0.5 M.

En todos los casos se utilizó un blanco, realizado agregando a la solución de sustrato (2ml), primero el ácido (2ml), y luego la enzima(2ml). Se midió la absorbancia de la mezcla de reacción frente al blanco a 235 nm.

DEFINICION DE UNIDAD Y ACTIVIDAD ESPECIFICA.

Una unidad de enzima se define como la cantidad que cataliza un incremento de 0.555 en la absorbancia en una celda de 1 cm a 235 nm durante un periodo de un minuto a pH 5.2 y 25°C.

El coeficiente de extinción del producto insaturado es 5.55×10^3 . La actividad enzimática se expresó en U por mg de enzima (Pilnik, 1978; Neufeld; Ginsburg, 1966; Chamorro, 1996).

c. Actividad de la Pectinesterasa (PE)

PRINCIPIO

Como esta enzima hidroliza los grupos metoxilos de la molécula de pectina, se puede medir la liberación de los grupos carboxilos, por titulación potenciométrica con álcali (Pilnik, 1978; Schmidt – Hebbel, 1982).

REACTIVO:

Solución de pectina al 1% (93% de metilación) disuelta en cloruro de sodio 0.2 M.
Solución de hidróxido de sodio 0.01 N.

PROCEDIMIENTO

Se colocan 19.9 ml de la solución de pectina al 1%, en un vaso precipitados, se calientan hasta 30°C. Se ajuste el pH a 7.5 con NaOH 0.01 N, se agrega 0.1 ml de la solución enzimática. Cada 5 minutos se ajusta el pH, lo que se hace por un espacio de 30 minutos, anotando cada intervalo la cantidad acumulada de álcali gastado. Las curvas se obtienen gráficamente los mililitros gastados de álcali versus tiempo.

Conviene trabajar en duplicado y calcular el promedio. El blanco, preparado con la solución enzimática calentada en un vaso de precipitados con agua hirviendo por 5 minutos, no debe presentar gasto de hidróxido de sodio, o bien, su valor debe ser restado del consumo total (Schmidt – Hebbel, 1982; Rangana, 1979).

DEFINICION DE UNIDAD

Según la fórmula de Kertesz, se multiplica el gasto total de ml de NaOH 0.01 N por el factor 3.1 y se divide por los ml aplicados de la solución de enzima. Este valor representa lo mg de grupos metoxilos separados por 1 ml de solución de enzima en 30 minutos, o bien unidades de pectinesterasa por ml de solución

enzimática (Schmidt – Hebbel, 1982).

También se define una unidad de PE, como la cantidad de enzima que libera una micromol de grupos carboxilos (o metanol), bajo las condiciones específicas de ensayo (Pilnik, 1978).

d. Actividad de la celulasa.

FUNDAMENTO

De igual modo, la acción de la celulasa sobre la celulosa, reduce el tamaño de la cadena de celulosa a polímeros cada vez más pequeños, si la hidrólisis es, severa se puede llegar a unidades de celobiosa y finalmente a glucosa con la consecuente liberación de grupos reductores, los cuales son cuantificados como glucosa, determinándose de esta manera la actividad de la celulosa (Crueger y Crueger, 1993).

Para la determinación de la actividad de la celulasa se utilizó el método recomendado por (IUPAC, 1987).

REACTIVO

Buffer: de citrato 0.05 M, pH = 4.8

Substrato: papel filtrante para celulose Saccharifying de 1.0 x 6.0 cm (mayor de 50 mg).

PROCEDIMIENTO

Añadir 1 ml de buffer citrato de sodio de 0.05 M a pH = 4.8 a un tubo de ensayo de un volumen mínimo de 25 ml.

Añadir 0.5 ml de enzima, diluida en buffer de citrato, se debe realizar cuando menos de 2 diluciones por cada muestra de enzima investigada (una solución debe liberar ligeramente más y uno ligeramente que 2.0 mg cantidad absoluta de

glucosa en las condiciones de reacción).

Temperatura a 50°C, añadir una mezcla de papel filtro, mezclar bien e incubar a 50°C por 60 minutos.

Agregar 3 ml de DNS y mezclar

Hervir exactamente 5 minutos en un baño de agua que esta hirviendo vigorosamente. Todas las muestras, blanco sin enzima, estándares de glucosa y el espectro cero deben ser hervidas juntas, pasado el tiempo de ebullición transferir a un baño de agua fría.

Agregar 20 ml de agua destilada ó dionizada. Mezclar completamente invirtiendo el tubo varias veces de arriba hacia abajo hasta que la solución se separe del fondo del tubo en cada inversión (esto es importante).

Cuando la pulpa se ha asentado bien, es decir, después de por lo menos 20 minutos, el color formado se mide en contraste con el espectro cero a 540 nm. Si la pulpa del papel no se asienta. Se hará así después de mover con una varilla.

Niveles o estándar para realizar la curva

Espectro cero	Blanco enzima
1.5 ml buffer citrato	1 ml de buffer de citrato
3.0 ml DNS	0.5 ml de sol de enzima
Hervir por 5 minutos	3.0 ml de DNS
20 ml de agua destilada	Hervir por 5 minutos
Leer la ABS a 540 nm	20 ml de agua destilada
	Leer la ABS a 540 nm.

DEFINICION DE LA UNIDAD FPU

Las unidades FPU que están basados en las unidades internacionales (IU)

IU: $1 \mu\text{mol min}^{-1}$ de glucosa (reduciendo los azúcares a glucosa) formado durante las reacciones de hidrólisis.

: 0.18 mg min^{-1} cuando el producto es glucosa.

Las cantidades absolutas de glucosa expresadas en FPU como una dilución crítica es de 2.0 mg

2,0 mg de glucosa = $2/0.18 \mu\text{mol}$.

Estas cantidades de glucosa fueron producidas mediante 0.5 ml de enzima en 60 minutos en la reacción de FPU.

$$\begin{aligned} 2.0 \text{ mg de glucosa} &= 2/0.18 * 0.5 * 60 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ ml}^{-1} \\ &= 0.37 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ ml}^{-1} \text{ (IU ml}^{-1}\text{)} \end{aligned}$$

FPU = 0.37 / [] de enzima para liberar 2.0 mg de glucosa = Uml⁻¹

3. OBTENCION DEL ZUMO

Tratamiento enzimático; se realizó de acuerdo al método de NOVO Madden, (1991) Presencia de pectina, mediante test de alcohol y presencia de almidón mediante la prueba de yodo (Gist Brocades, 1991).

4. VISCOSIDAD DE LA PULPA Y DEL ZUMO

- Análisis reológico mediante el viscosímetro Brookfield, Splinde tipo disco (Mitschka, 1982).
- Viscosidad del zumo, empleándose el viscosímetro capilar Cannon Fenske N° 100 (Lewis, 1993).

5. CARACTERIZACION DEL ZUMO Y ALMACENAMIENTO

Se realizaron las siguientes determinaciones analíticas:

Acidez total, pH, grados brix, vitamina C, azúcares reductores, viscosidad, por los métodos descritos en C.1, además de los siguientes análisis:

Transparencia; por espectrofotometría, (Versteeg, 1980). Espectro de Absorción, longitud de onda de máxima absorvancia (Ramette, 1983; Gordon, 1987).

Densidad, método del picnómetro (Madrid, 1994).

Los análisis físico químicos se realizaron cada 30 días (0, 30, 60, 90); el análisis microbiológico se realizó al inicio y al final del almacenamiento, el tiempo de almacenamiento fue de 3 meses y el análisis sensorial al final del almacenamiento

D. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

A continuación se presenta las etapas del trabajo de investigación.

1. Indices de madurez y caracterización del membrillo.
2. Determinación de la Actividad Enzimática de la Poligalacturonasa (PG) y Biopectinasa LM.
3. Obtención del zumo
4. Aspectos reológicos de la pulpa y del zumo.
5. Caracterización del zumo y almacenamiento

1. EVALUACION DE LOS INDICES DE MADUREZ Y CARACTERIZACION DEL MEMBRILLO.

Los índices de madurez se determinaron mediante los métodos de análisis físico químicos, evaluándose el pH, ° Brix, acidez titulable, humedad, relación del peso pulpa/cáscara y variación del color de la cáscara (Shewfelt, 1993).

En las determinaciones físicas, se evaluaron las características biométricas y la relación pulpa cáscara.

En el análisis químico de la pulpa del membrillo maduro se consideró: humedad, proteína, grasa, fibra, ceniza, carbohidratos, ° Brix, pH, acidez titulable, pectina, azúcares reductores, azúcares totales, almidón y vitamina C; los métodos utilizados se indican en C.1.

2. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA

a. ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA POLIGALACTURONASA (PG)

Se determinó la actividad enzimática de la Poligalacturonasa, teniendo en cuenta el método señalado en la parte de métodos de análisis, C.2.

b. ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA BIOPECTINASA LM.

Se determinó la actividad enzimática de la Biopectinasa LM, teniendo en cuenta el método señalado en la parte de métodos de análisis, C.2.

3. OBTENCION DEL ZUMO

1) Acondicionamiento de la pulpa

El acondicionamiento de la pulpa de membrillo se realizó tomando como base el flujo de operaciones de la figura 5 (Ponce, 1996).

A continuación se describe cada operación que se indica en la figura:

Materia Prima

Se utilizó los frutos maduros de membrillo (*Cydonia vulgaris*) seleccionado, de acuerdo a los criterios mencionados anteriormente.

Selección

Se seleccionaron los frutos que se encontraron aptas para el proceso, teniendo en cuenta la sanidad.

Lavado

Se efectuó por inmersión y frotamiento en agua, para quitar partículas extrañas de

la superficie.

Pelado

Se realizaron en forma manual, utilizando un cuchillo de acero inoxidable.

Pulpeado

Se realizó en una licuadora semi industrial, con un tiempo de 5 minutos, lo que nos permite obtener una pulpa fina.

Congelado

Se congelaron en bolsas de polietileno de alta densidad a -18°C durante el periodo que se realizaron las pruebas experimentales.

2) Tratamiento enzimático

El tratamiento enzimático de la pulpa de membrillo en función de la concentración de enzima, temperatura y del tiempo de hidrólisis, evaluándose el rendimiento de zumo.

La prueba para determinar la presencia de pectina y almidón se trabajó con la concentración de enzima, temperatura y tiempo de hidrólisis óptimo; además se determinó la estabilidad a la sedimentación, las muestras de cada tratamiento se almacenó en refrigeración, siendo observadas a las 24 horas presencia de sedimento (Madden, 1991).

3) Obtención

Se realizó de acuerdo al flujograma de la figura 6

Pulpa Acondicionada

Se utilizó la pulpa acondicionada de acuerdo al flujograma de la Figura 6

Hidrólisis enzimática

La pulpa de membrillo fueron tratadas enzimáticamente con la dosis óptima de

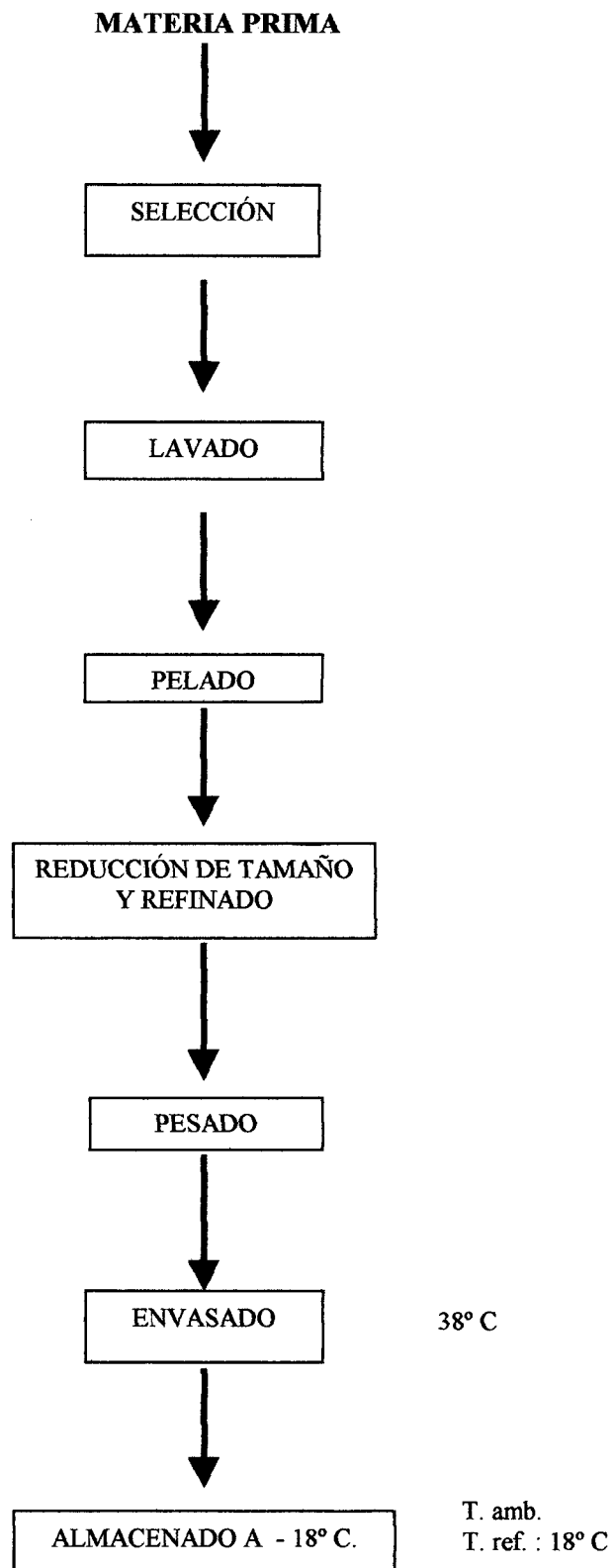


Figura 5. Flujograma para el acondicionamiento de la pulpa de membrillo.

Poligalacturonasa y Biopectinasa encontrada en la fase anterior.

Las muestras fueron llevadas a incubación a 50°C (+- 2°C) en un baño maría con control automático de temperatura, por espacios de 30, 60 y 90 minutos según corresponda, de acuerdo a la combinación de tiempo y concentración de enzima.

Prensado

Se realizó utilizando una prensa manual.

Inactivación Enzimática

Finalizado el período de incubación de las muestras, se procedió a la inactivación de la enzima a 90° C/ 60 segundos (Versteg, 1980; Benshalom, 1986).

Centrifugación

Las muestras, sin actividad enzimática, fueron centrifugadas a 1000 rpm/ 20 minutos para zumo de membrillo, pero puede variar de acuerdo a la fruta (Viquez, 1981)

Envasado y coronado

Se envasaron en caliente siendo inmediatamente sellados, para crear vacío en las botellas (Cheftel, 1980).

Enfriado

Se enfriaron por inmersión en agua hasta 38° C, que facilita el secado de la superficie de la botella.

Almacenado

El zumo se almacenó por 90 días a temperaturas de refrigeración a 10° C y a temperaturas ambiente a 25°C; realizándose los análisis físico químicos cada 30 días y el análisis microbiológicos al inicio y al final del almacenamiento.

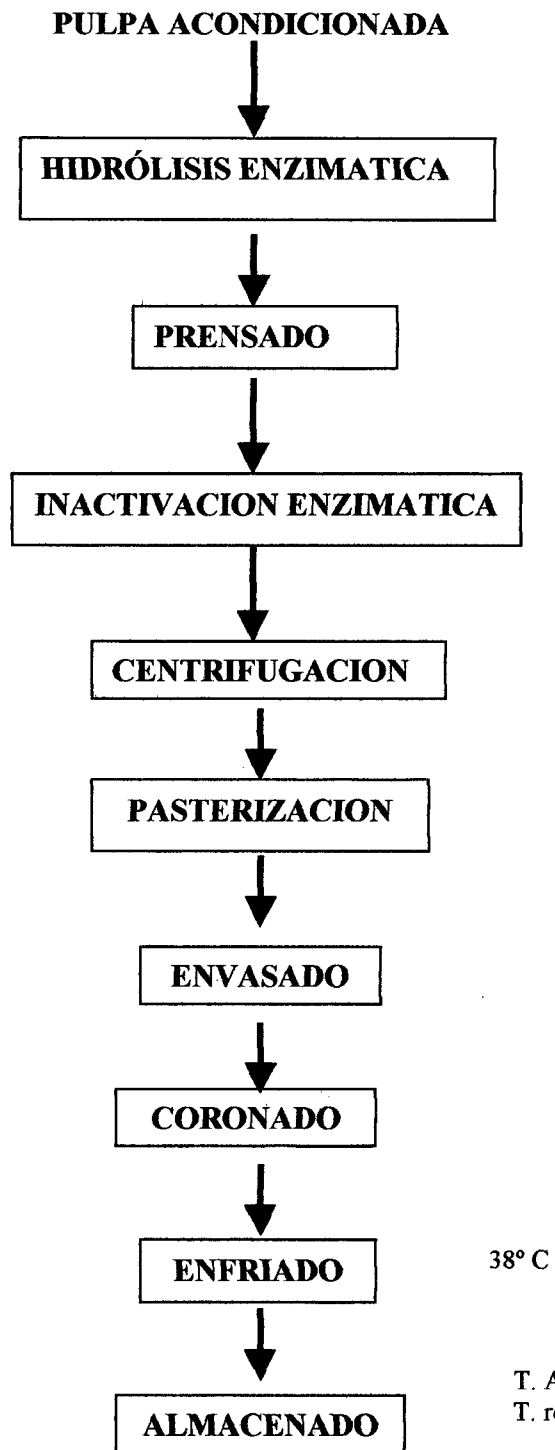


Figura 6. Flujograma definitivo para la obtención de zumo de membrillo mediante hidrólisis enzimática de la pulpa.

4. ASPECTOS REOLOGICOS DE LA PULPA Y DEL ZUMO

Se determinó el comportamiento de la viscosidad de la pulpa de membrillo a 25 °C; antes del tratamiento enzimático y después del tratamiento enzimático. Para estas pruebas se utilizó el viscosímetro Brookfield LVT con los spindles N° 3 (disco). Empleándose los parámetros óptimos. Se evaluó la variación de la viscosidad (mPa.S) a la temperatura óptima durante el tratamiento enzimático.

Para caracterizar la pulpa reológicamente se utilizó el método de la ley de la Potencia (Steffe, 1992); así como los datos técnicos AR-82 Brookfield, para el uso de spindles tipo disco (Mitschka, 1982).

Se evaluó la viscosidad del zumo obtenido empleándose el viscosímetro capilar Cannon Fenske N° 100 (Lewis, 1993).

5. CARACTERIZACION DEL ZUMO Y ALMACENAMIENTO

a. Análisis físico químico del zumo de membrillo

El zumo de membrillo fue caracterizado teniendo en cuenta la determinación de: acidez total, pH, grados Brix, vitamina C azúcares reductores, azúcares totales, transparencia, absorvancia y viscosidad.

Las evaluaciones en el almacenamiento a temperatura de refrigeración de 10° C y a temperatura ambiente de 25 ° C se realizaran cada 30 días / 90 días.

b. Análisis microbiológico

Se realizó siguiendo los métodos de análisis (ICMSF, 1983). Se realizaron los Indices de Numeración de microorganismos aerobias viables mesófilos (NMAVM), Numeración de mohos y levaduras y Numeración de Lactobacillus, análisis requeridos por las normas del INDICOPI.

c. Evaluación sensorial

Se tomó como base las características principales usando los atributos de sabor, color, aroma y transparencia; para lo cual se utilizó una escala hedónica de 9 puntos, los resultados de cada panelista fueron sumado obteniéndose el promedio con el cual se establece la calificación (Anzaldua, 1994).

Los zumos fueron evaluados por 18 panelistas no entrenados, pero con cierto grado de experiencia en medir atributos como: color, brillantez, aroma, sabor y sobre todo aceptabilidad general.

La evaluación sensorial se basó en una escala hedónica, donde los valores 9 a 1 correspondieron a las frases descriptivas gusta muchísimo y disgusta muchísimo, respectivamente

Los panelistas fueron estudiantes de la Facultad de Industria Alimentarias de la UNAS.

Durante las pruebas sensoriales, se pidieron a los panelistas evaluar 2 muestras codificadas, 50 ml en cada vaso; el panel fue realizado en laboratorio de evaluación sensorial, a horas de la mañana (9 – 12 a.m.), con suficiente suministro de luz natural.

E. DISEÑO EXPERIMENTAL

1. Tratamiento enzimático de la pulpa con Poligalacturonasa (PG)

El diseño experimental se representa esquemáticamente en la figura 7, el cual fue estructurado de tal forma que permite la evaluación de la acción enzimática. Este diseño muestra detalles de las variables en estudio, explicándose el significado de cada variable en la página 59.

Los datos con las que se va a ejecutar el diseño experimental son los siguientes:

A : Concentración De Enzima (PG) (V/P)

A₁ : 0.01%

A₂ : 0.03%

A₃ : 0.05%

B : Temperatura

B₁ : 40° C

B₂ : 50° C

B₃ : 60° C

C : Tiempo De Hidrólisis

C₁ : 30 minutos

C₂ : 60 minutos

C₃ : 90 minutos

El mejor tratamiento se determinó teniendo en cuenta el rendimiento de zumo (Rhom enzyme, 1980), para lo cual los valores experimentales fueron evaluados estadísticamente.

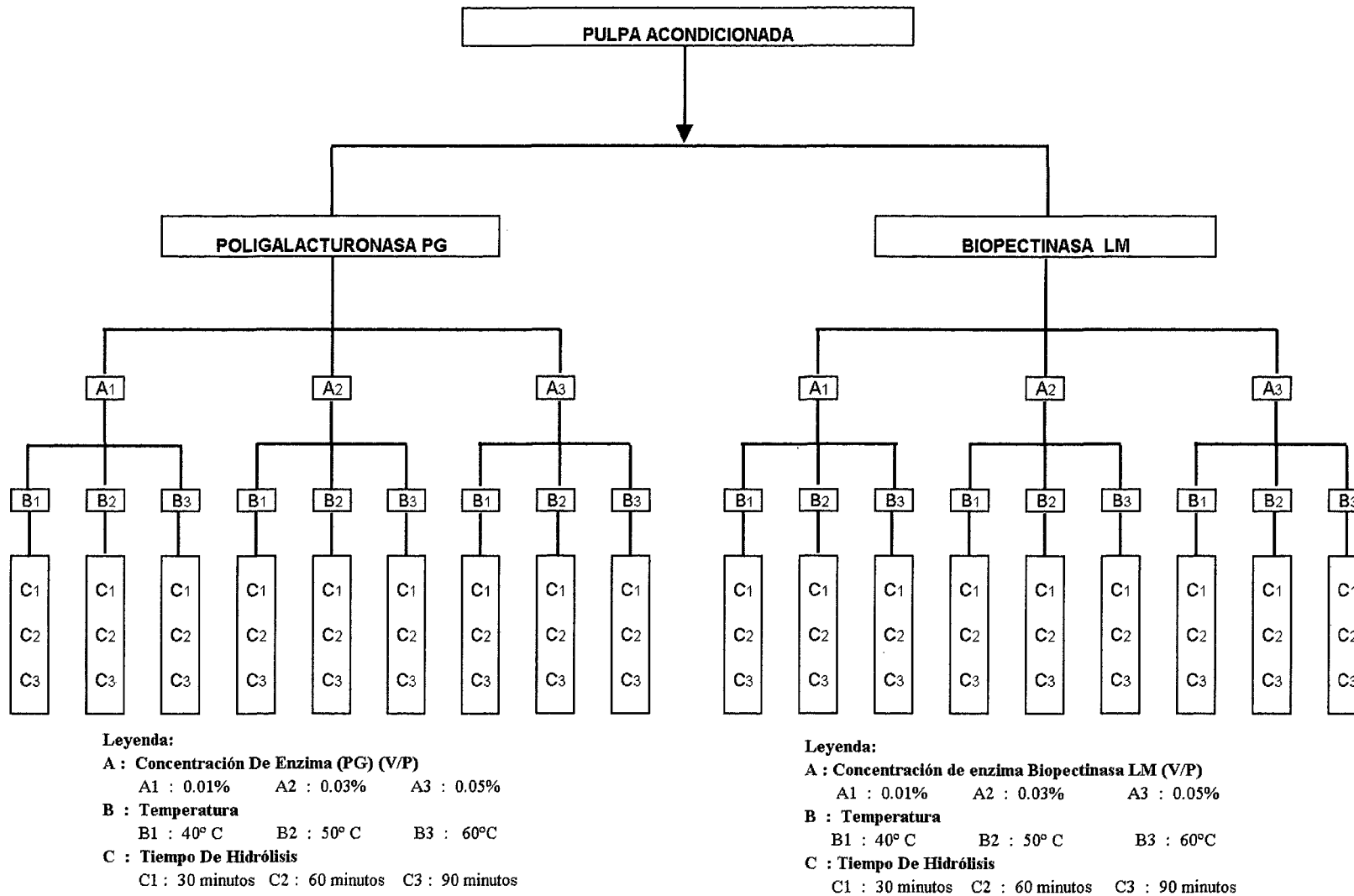
2. Tratamiento Enzimático de la pulpa con Biopectinasa LM

El diseño experimental se representa esquemáticamente en la figura 7, el cual fue estructurado de tal forma que permite la evaluación de la acción enzimática. Este diseño muestra detalles de las variables en estudio, explicándose el significado de cada variable en la página 59.

Los datos con las que se va a ejecutar el diseño experimental son los siguientes:

A : Concentración de enzima Biopectinasa LM (V/P)

A₁ : 0.01%



A₂ : 0.03%

A₃ : 0.05%

B : Temperatura

B₁ : 40° C

B₂ : 50° C

B₃ : 60°C

C : Tiempo De Hidrólisis

C₁ : 30 minutos

C₂ : 60 minutos

C₃ : 90 minutos

El mejor tratamiento se determinó teniendo en cuenta el rendimiento de zumo (Rhom enzyme, 1980), para lo cual los valores experimentales fueron evaluados estadísticamente.

F. ANALISIS ESTADISTICO

El análisis estadístico para el diseño experimental de la figura 7, se adecua a un diseño estadístico bloque completo al azar (DBCA) con arreglo factorial de 3 A x 3 B x 3 C con 2 repeticiones, Daniel (1996), (3 concentraciones de cada enzima, 3 temperaturas y 3 tiempos de hidrólisis) con 2 repeticiones, es decir 27 observaciones por cada enzima, con un total de 54 observaciones (2 enzimas), los resultados de cada enzima (rendimientos) son evaluados estadísticamente.

La significación estadística se evaluó con la prueba de Tukey al 5% de probabilidad seleccionándose el mejor tratamiento.

Con relación a las variables estudiadas se consideran:

Concentración de enzima

Se utilizó concentraciones de 0.01, 0.03 y 0.05% de Poligalacturonasa PG/100 gr de pulpa, teniendo en cuenta la información técnica citada en métodos de análisis C2.

Además se utilizó 0.01, 0.03 y 0.05% de Biopectinasa LM /100 gr de pulpa, según la información técnica, citada en C2.

Tiempo de hidrólisis

Los tiempos considerados para la hidrólisis de la pulpa fueron de 30, 60 y 90 minutos, rango de tiempos que normalmente son utilizados cuando se utilizan hidrólisis enzimática de pulpas o clarificado de jugos en caliente (Novo, 1986; Gutierrez, 1983).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. INDICES DE MADUREZ Y CARACTERIZACION DEL MEMBRILLO

1. INDICES DE MADUREZ

En el Cuadro 3, se presentan los resultados de las evaluaciones realizados en muestras de membrillo durante el desarrollo de la madurez comercial.

Cuadro 3. Grados de madurez del membrillo

CARACTERÍSTICAS DEL MEMBRILLO	PROMEDIO DE LOS RESULTADOS					
	Humedad	°Bx	Acidez. Titulable	pH	P/C	IM
Verde	77.70	8.67	0.23	3.68	1.15	38.03
Pintón	82.78	10.66	0.32	3.61	1.17	33.12
Maduro	83.33	12.26	0.41	3.37	1.19	30.20
Sobre maduro	82.84	8.06	0.45	3.30	2.10	18.07

En el cuadro anterior se puede observar que el contenido de humedad, los sólidos solubles y la relación pulpa / cáscara (P/ C); presentan contenidos que se incrementan conforme transcurre la maduración, dicha evaluación se realizó después de 8 a 12 días de cosecha debido a que la fruta fue obtenida de la ciudad de Lima, alcanzando una humedad de 83.33; 12.26 ° Brix y una relación pulpa / cáscara de 2.10 .

El incremento de los sólidos solubles durante la maduración comercial, esta relacionado con los polisacáridos de las membranas celulares, ya que el contenido en almidón de estas frutas es casi despreciable, equilibrio que se inclina hacia la formación de azúcares durante el proceso de maduración (Duckworth, 1968).

En el Cuadro 3, se puede apreciar que el contenido de sólidos solubles es mayor cuando el membrillo se encuentra maduro, observándose que en la fruta sobremaduro disminuye, debido al inicio de la fermentación, debido a estas características se seleccionó el membrillo con un índice de madurez de 30.20 para la utilización en la obtención de zumo.

Los resultados de las evaluaciones de pH indican que se produce un aumento en la concentración de ácidos ionizables, lo que produce una disminución en el valor del pH.

La acidez titulable de la pulpa indica que este aumenta conforme transcurre la maduración, llegando a un contenido máximo de 0.45% de ácido málico. Este comportamiento no coincide con la mayoría de las frutas, donde la acidez disminuye conforme el fruto se acerca al estado maduro (Vinicio Sáenz, 1993).

En el caso del membrillo la producción de ácido aumenta durante la maduración; esto se debe a factores como son la humedad del ambiente donde creció la planta y los suelos excesivamente ácidos, también puede afectar los valores internos de acidez.

La acidez titulable es expresado en ácido málico, ya que este ácido orgánico es el que prevalece en esta fruta al estado maduro, presentando un contenido de 65% (Nelson, 1980).

2. CARACTERÍSTICAS DEL MEMBRILLO

a. Características biométricas.

Para las determinaciones físicas se utilizó fruto de membrillo, el cual fue elegido en base al rendimiento de zumo y de acuerdo al índice de madurez en la cual se utilizó el fruto.

El Cuadro 4, nos muestra los resultados y las principales características del fruto de membrillo. Las características físicas del membrillo de longitud, diámetro y peso que están cercanos a los datos reportados, para la misma variedad (8 a 15 cm de longitud, 6 a 12 cm de diámetro y su peso varía entre 200 a 700 gr.) (Muñoz, 1976)

Cuadro 4. Características biométricas del fruto de membrillo tomadas en 36 muestras.

CARACTERÍSTICAS DEL MEMBRILLO	OBSERVACIONES
Color (visual)	Amarillo
Longitud media (cm)	10.40 ± 1.0
Diámetro medio (cm)	7.22 ± 1.0
Peso medio (gr.)	145 ± 20
Rend. Pulpa / fruta %	60 – 80
Rend. Zumo / fruta %	50 – 62

El rendimiento de la pulpa en relación al fruto entero fue de 60 a 80 %; en cuanto al rendimiento obtenido del jugo de membrillo fue de 50 a 62 % semejante a lo reportado por la bibliografía Chefftel, (1976) para zumos de diferentes frutas, entre ellas las de manzana con 65 %. El color de pulpa se determinó mediante dilución en un solvente (etanol) en donde la máxima absorbancia (4.000) se produjo a 230 y 240nm de longitud de onda (Ponce, 1996).

Relación de pulpa y cáscara del fruto de membrillo

El Cuadro 5, nos muestra los resultados de los porcentajes pulpa/ cáscara de los diferentes tamaños de los frutos de membrillo, además se observa que de acuerdo al tamaño tienen variaciones en el porcentaje de pulpa, de 86.41 a 84.77 obteniendo como promedio de 85.39% y 14.76% para la cáscara, pudiendo

indicar que el tamaño grande presentó mayor porcentaje de pulpa y menor % de cáscara.

Cuadro 5. Determinación porcentual de las fracciones del fruto

MEMRBILLO Tamaño	PULPA		CASCARA	
	W (gr.)	%	W (gr.)	%
Grande	150.67	86.41	22.24	13.60
Mediano	118.76	84.99	21.42	15.01
Pequeño	115.75	84.77	20.62	15.67
Promedio	128.39	85.39	21.43	14.76

b. Análisis químico proximal

Los resultados del análisis químico proximal del membrillo (*Cydonia vulgaris*) se presentan en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Resultados del análisis químico proximal de la pulpa de membrillo.

COMPONENTES	%
Humedad	82.7
Proteína (N x 6.25)	0.3
Grasa	0.1
Ceniza	1.3
Fibra	1.4
Carbohidratos	14.2

Los resultados del Cuadro 6, muestran valores similares a los reportados por FAO, (1961); Collazos, (1975), los cuales dependen del grado de madurez, clima, suelo y entre otros factores. Además podemos observar que los componentes que más destacan son la humedad con 82.7% y el contenido de

carbohidratos con 14.2%.

c. Análisis físico químico de la pulpa de membrillo.

El Cuadro 7, nos muestra los resultados del análisis físico químico del membrillo con respecto a la parte comestible

Cuadro 7. Características físico químico de la pulpa de membrillo en 100 gr de parte comestible

COMPONENTES	RESULTADOS %
Humedad	82.7
Sólidos totales	17.3
Sólidos solubles (° brix)	12
PH	3.6
Acidez titulable (ác. Málico)	0.43
Índice de madurez (°Bx/ac titulable)	30.20
Vitamina C (ác. Ascórbico reducido)	13.06 mg
Pectina (como Pectato de calcio)	0.51
Azúcares reductores (como glucosa)	12.56
Azúcares totales (como glucosa)	15.95
Almidón	0.83
Índice de flujo (n)	0.17
Índice de consistencia (m) en Pa.S ⁿ	74.84

Los contenidos de vitamina C, 13.06 mg y azúcares reductores 12.56 % en la pulpa presentaron valores muy cercanos a los reportados en la información bibliográfica 12.5 mg y 9.1 % respectivamente (Collazos, 1975; Yoslyn y Tressler, 1961).

El contenido de almidón encontrado fue de 0.83 % y el de pectina de 0.51 % (pectato de calcio), se sabe que en los casos de manzana, pera y membrillo contienen primitivamente almidón, el cual se transforma en la madurez en glúcidos solubles por la acción de las enzimas contenidas en la fruta; al mismo

tiempo que aumenta la cantidad de azúcar (Schmidt – Hebbel, 1981).

El pH de 3.6 encontrado, (que es un factor importante en la acción enzimática) para la obtención del zumo, mediante la hidrólisis enzimática (Belitz, 1988; Chefftel, 1980).

B. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA

1. ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA POLIGALACTURONASA (PG).

La actividad de la Poligalacturonasa (PG), se determinó según lo descrito en C.2 de la parte de métodos de análisis. Mientras que los datos numéricos se muestran en el Anexo B - 1.

Se determinó una actividad pectolítica de 374.44 umoles de grupos de aldehídos X ml de enzima original / minuto ó 374.44 U/ ml., pH de 5.0 ya 30°C.

Sigma reporta una actividad de 445 U/ml, para esta enzima, la cual expresa la cantidad de enzima que libera 1 mol de ácido galacturónico a partir del ácido poligalacturónico por minuto a pH 4 y a 25°C (Neufeld et, al, 1968).

Ambos resultados teórico y práctico son determinados utilizando el mismo sustrato, ácido poligalacturónico; pero a otras condiciones de pH y temperatura, y el ácido péctico de peso molecular alto es más soluble a pH 5.0 Rhom, (1978), menciona que las pectinasas almacenadas en un lugar fresco (aprox. 4° C), experimenta pérdida de actividad al cabo de un año de 5 – 10 %, lo que podría explicar la diferencia; además de la diferencia en los métodos utilizados.

En la Figura 8, se muestra la curva de los datos experimentales los cuales expresan la variación del número de micromoles de grupos aldehídos Vs tiempo en minutos de acción enzimática.

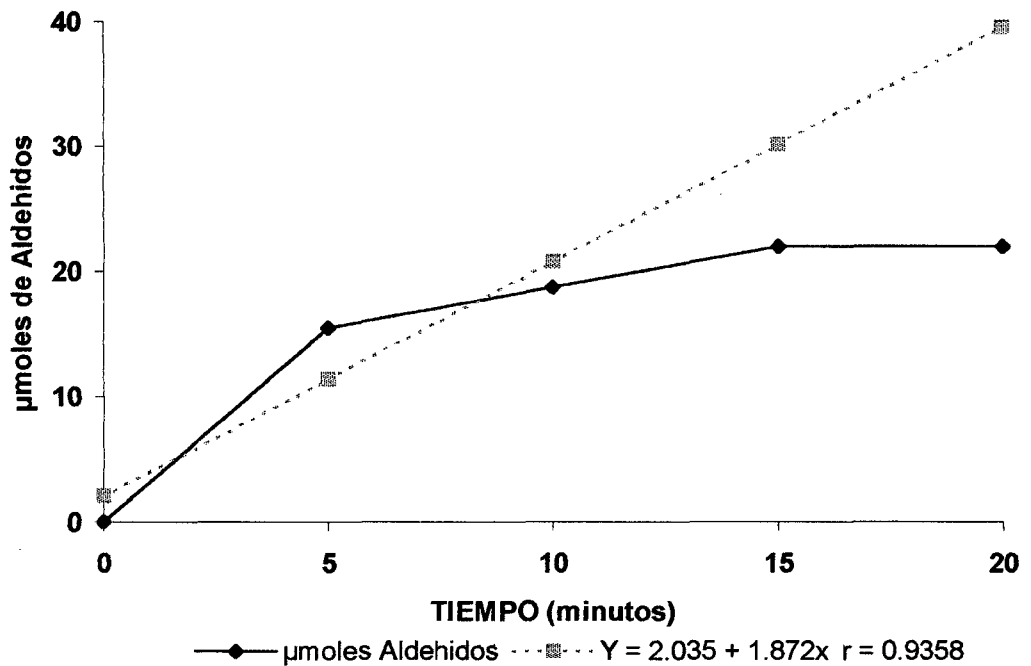


Figura 8. Actividad enzimática de Poligalacturonasa

2. ACTIVIDAD ENZIMATICA CON BIOPECTINASA LM.

Este análisis se realizó con el fin de evaluar el efecto de la combinación de pectinasas (PG, PE, PL) más celulasas, sobre el rendimiento de extracción de zumo (Rhom, 1980).

a. Actividad enzimática de la Poligalacturonasa (PG)

Se determinó por el método descrito en el capítulo de método de análisis C.2.

En la Figura 9, se muestra la curva de los datos experimentales que expresan la variación de números de micromoles de aldehídos Vs. Tiempo en minutos de acción enzimática. Los datos numéricos se muestran en el anexo B-2.

Realizado el análisis de regresión lineal de los datos experimentales, se determinó una actividad pectinolítica de la Biopectinasa de 390.72 u/mol.

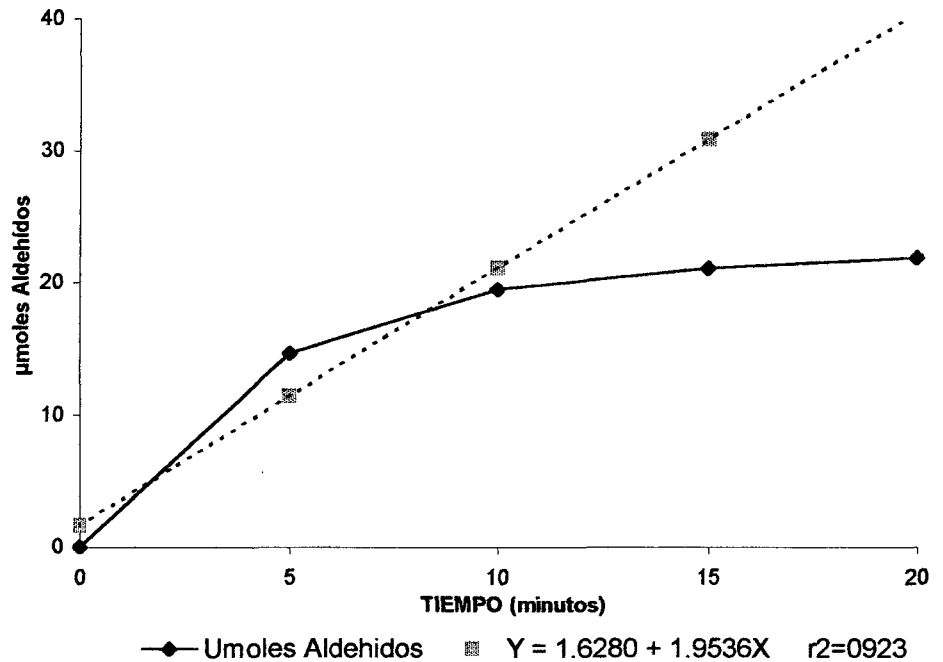


Figura 9: Actividad enzimática (PG) de Biopectinasa LM

b. Actividad enzimática Pectinliasa (PL) en Biopectinasa LM

La actividad enzimática fue determinada según lo descrito en el capítulo C.2.b de la parte de métodos de análisis. En la Figura 10 se muestran las variaciones de la absorbancia Vs. el tiempo teniendo en cuenta dos concentraciones ($0.125 \mu \text{ PL/ml}$, $0.016 \mu \text{ PL/ml}$) de la enzima Biopectinasa; observándose que la variación de la absorbancia es mayor conforme aumenta la concentración de enzima, lo que se aprecia matemáticamente por los valores de las pendientes de cada línea.

Después de aplicar el análisis lineal a los datos experimentales se obtienen las ecuaciones que se muestran en el Anexo B-3; cuyas pendientes, nos permiten determinar la actividad enzimática de 27.29 U/ml . y 21.29 U/ml .

respectivamente; de las concentraciones de enzima utilizadas se obtiene un incremento en la absorvancia de 0.03786/ minuto y 0.02954/ minuto. SIGMA reporta una actividad de 125 unidades/ mg cuando se trabaja con la pectina codificada como P 9135, sustrato diferente al utilizado para la evaluación.

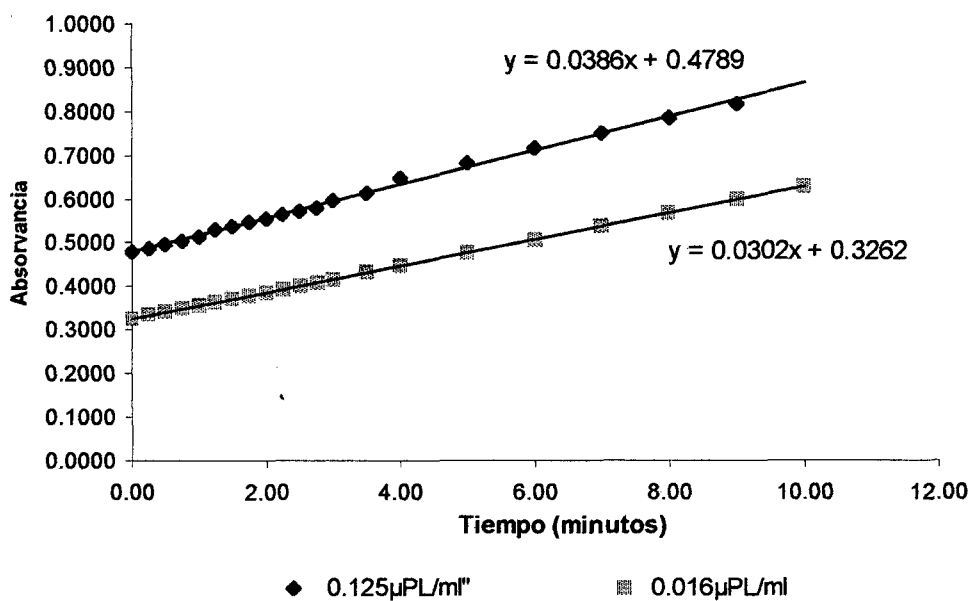
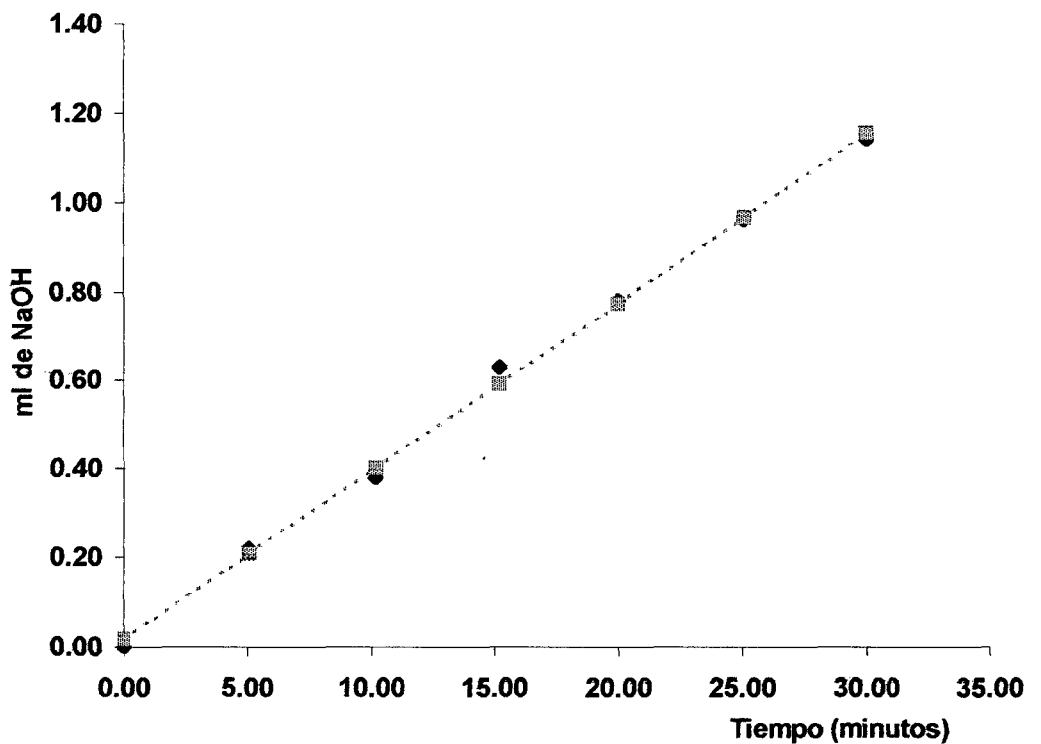


Figura 10. Actividad enzimática de la (PL) en Biopectinasa LM

c. Actividad enzimática de la Pectinesterasa (PE) en Biopectinasa LM

La actividad se determinó según lo descrito en el capítulo C.2.c de la parte de métodos de análisis. En la Figura 11 se muestra la variación de los ml. de hidróxido de sodio (NaOH) 0.01N gastados Vs el tiempo; observándose que el gasto aumenta conforme se incrementa la concentración de enzima.

Después de aplicar el método de regresión lineal a los datos experimentales obtenidos, ver Anexo B-4; se determinó la concentración de enzima utilizada presentando un valor de 35.34 UPE/ml. sin embargo **SIGMA** reporta 62 Unidades / mg , estos valores no se pueden comparar, por que en este caso la unidad se entiende como mg. de grupos metoxilos separados por un ml de solución de enzima en 30 minutos; o bien unidades de pectinesterasas por ml de solución enzimática (UPE/ml) y el otro caso sería como la cantidad de enzima que libera/ microequivalente de ácido a partir de pectina por minuto a pH = 7.5 y 30°C.



◆ Datos reales ---■--- $Y = 0.0162 + 0.0378x$ $r^2 = 0.997$

Figura 11. Actividad enzimática de la Pectinesterasa (PE) en Biopectinasa

d. Actividad enzimática de celulasa en Biopectinasa LM

La actividad enzimática fue determinada según lo descrito en el capítulo C.2.d de la parte de métodos de análisis. Los datos numéricos de la curva estándar de la concentración de glucosa Vs absorbancia a 540 nm. Se muestran en el Anexo B-5.

Se determinó la actividad de la celulasa utilizando como sustrato papel de celulosa en buffer citrato 0.005M a pH 4.8 a 50°C. por 60 minutos; determinándose una actividad celulolítica de 9.25×10^{-3} U/ml

Los resultados cuantitativos de los datos experimentales se obtienen al construir una curva estándar de glucosa lineal por absorbancias en contraste a la concentración de la glucosa convertida.

La caracterización de las enzimas de la celulosa posee problemas especiales para los enzimólogos; los que se encuentran raramente en el estudio de otras enzimas, se presenta con una situación donde los estudios cinéticos son difíciles ya que el sustrato natural es tanto insoluble como estructuralmente variable, y relativamente indefinido con respecto a las concentración y forma química donde a menudo una multitud de endo y exoglucanase actúan en sinergia de manera compleja y donde se forman frecuentemente una variedad de productos finales y especies de transglicosilación que envuelve varios mecanismos de control de retroalimentación (IUPAC, 1985).

Deduciéndose que la enzima Biopectinasa Lm, es una mezcla de enzimas pectinolíticas (PG, PE, PL) y celulolíticas .

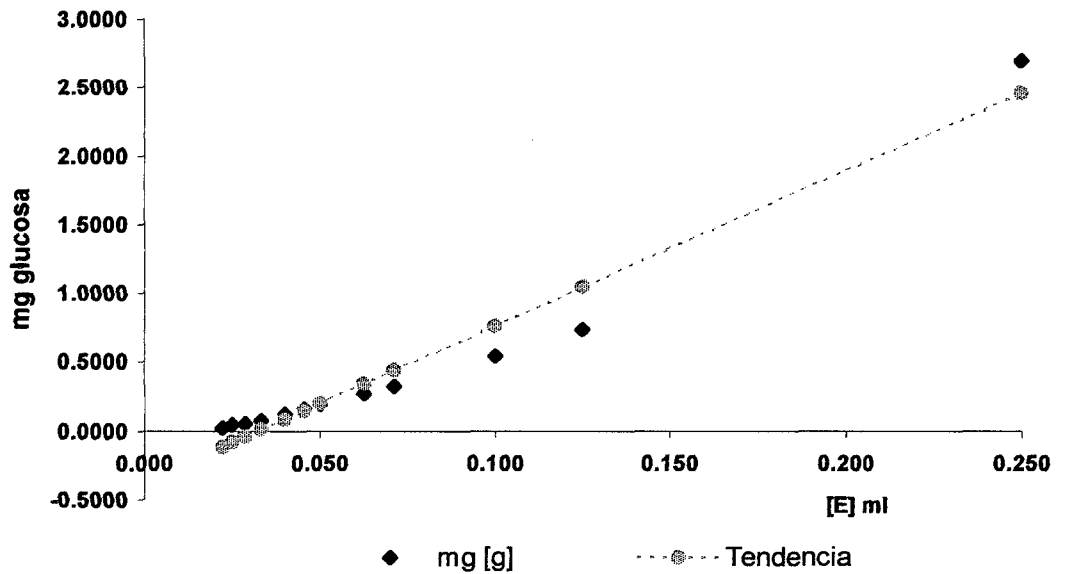


Figura 12. Actividad enzimática de Celulasa en Biopectinasa LM

C. OBTENCION DEL ZUMO

1. Acondicionamiento de la pulpa

La pulpa de membrillo fue acondicionada tal como se indica en el flujograma de la Figura 13, donde se puede apreciar que se obtiene un rendimiento de 84.74 % hasta la reducción de tamaño.

Debemos indicar que durante la operación de pulpeado, la pulpa de membrillo empieza a cambiar de color, de crema o amarillo a un color marrón negrusco; este cambio de color está relacionado con el pardeamiento enzimático lo que nos indica la presencia de enzima polifenoloxidasas que está presente en el pardeamiento de la pulpa de membrillo, lo que se hace evidente durante el procesamiento (Nelson, 1980).

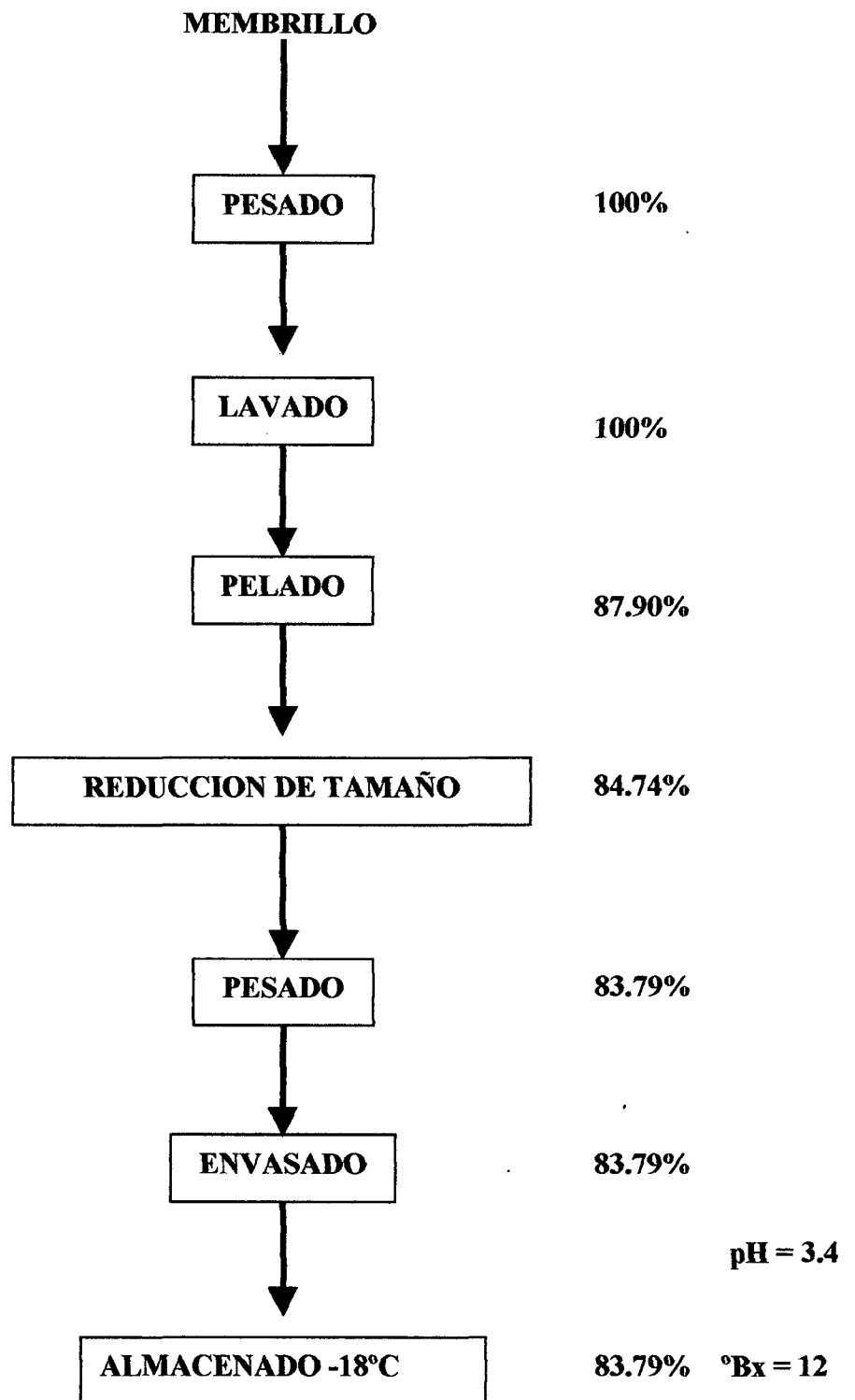


Figura 13. Flujograma para el acondicionamiento de la pulpa de membrillo.

Cabe mencionar que no se realizó la operación de blanqueado, debido a que, en esta operación se pierden minerales, vitaminas hidrosolubles y otros compuestos hidrosolubles Fellows, (1994). Cuando la fruta es sometido a la operación de blanqueado se puede notar un menor rendimiento de pulpa por efecto del calor que recibe el alimento (Pélaez, 1998).

2. Tratamiento Enzimático de la pulpa de membrillo

a. Tratamiento enzimático con Poligalacturonasa (PG).

El tratamiento enzimático se realizó con la enzima Poligalacturonasa (PG) y utilizando 100 gr. de sustrato (pulpa de membrillo) por cada tratamiento y variando los parámetros de temperatura (°C), tiempo de hidrólisis (minutos) y concentración de enzima [E], resultados que se muestran en el Cuadro 8.

En este cuadro, se presentan los resultados del rendimiento de zumo, en volumen; extraído de la pulpa de membrillo pardeada, sin diluir y por gravedad con un tiempo de filtración de 15 minutos para todos los casos; apreciándose que el efecto de la enzima es mayor conforme aumenta la concentración y temperatura; de igual manera el rendimiento del zumo aumenta conforme aumenta el tiempo de hidrólisis hasta 30 minutos.

Además las muestras testigos (blanco) no presenta rendimientos de zumo en la extracción, ya que no han sido tratado enzimáticamente.

A diferencia de otras frutas el zumo de membrillo no puede obtenerse simplemente exprimiendo o mezclando la pulpa debido a la alta viscosidad que posee, esta propiedad se debe a la pectina que contiene la fruta madura .

CUADRO 8. Rendimiento de zumo extraído por acción enzimática de Poligalacturonasa (PG) sobre pulpa pardeada, sin diluir (*)

A [E]	B °C	C min	RENDIMIENTO DEL ZUMO Volumen (ml)	OBS.
[1]	40	30	20.03	--+
[1]	40	60	20.25	-++
[1]	40	90	19.50	+++
[1]	50	30	20.13	-++
[1]	50	60	20.27	-++
[1]	50	90	19.95	+++
[1]	60	30	19.87	-++
[1]	60	60	20.96	+++
[1]	60	90	20.03	+++
[2]	40	30	22.02	--+
[2]	40	60	19.90	-++
[2]	40	90	20.05	-++
[2]	50	30	23.42	+++
[2]	50	60	23.92	-++
[2]	50	90	21.22	+++
[2]	60	30	22.64	-++
[2]	60	60	19.68	+++
[2]	60	90	21.90	+++
[3]	40	30	21.55	-++
[3]	40	60	20.62	+++
[3]	40	90	20.23	+++
[3]	50	30	20.76	+++
[3]	50	60	23.34	+++
[3]	50	90	19.29	+++
[3]	60	30	24.74	+++
[3]	60	60	20.30	+++
[3]	60	90	24.16	+++

(*) : Promedio de dos repeticiones

--- : Inestable, alta sedimentación

--+ : Inestable, regular sedimentación

-++ : Poco estable, poca sedimentación

+++ : Estable, muy poca sedimentación

[1] : Concentración de enzima 0.01% (V/P) 0.1 ml de enzima/1kg de pulpa

[2] : Concentración de enzima 0.03% (V/P) 0.3 ml de enzima/1kg de pulpa

[3] : Concentración de enzima 0.05% (V/P) 0.5 ml de enzima/ 1kg de pulpa

Debido a estos problemas el uso de enzimas pectolíticas es parte integral de la tecnología moderna de los jugos de fruta, la contribución de las enzimas es muy importante para un procesamiento rápido, para un mayor rendimiento y asegurar la calidad del producto terminado (Novo, 1986).

Los resultados del Cuadro 8, fueron analizados estadísticamente mediante un diseño bloque completo al Azar con arreglo factorial 3A x 3B x 3C con 2 repeticiones, el análisis de varianza se muestra en el Cuadro 9

El ANVA del Cuadro 9, al nivel de 5% presentó una alta significación estadística para todos los factores (Concentración de enzima [A], temperatura [B] y tiempo de hidrólisis [C]) y para las intersecciones A*B, B*C y A*B*C, adquiriendo mayor importancia para el análisis estadístico la triple interacción

Cuadro 9. Análisis de varianza de rendimiento de zumo extraído, por acción de Poligalacturonasa (PG)

FV	GL	SC	CM	Fc	Ft 5%	Sig.
Bloque	1	1.0113	1.0113	1.43	0.2421	N.S
Tratamiento	27	130.3656	4.8284	6.84	0.0001	**
A [Enzima]	2	28.5568	14.2784	20.23	0.0001	**
B (Temp.)	2	12.8164	6.4082	9.08	0.0010	**
C (Tiempo)	2	9.0293	4.5147	6.40	0.0055	**
A*B	4	20.5450	5.1363	7.28	0.0005	**
A*C	4	6.8029	1.7007	2.41	0.0749	N.S
B*C	4	27.9380	6.9845	9.90	0.0001	**
A*B*C	8	23.6658	2.9582	4.19	0.0025	**
Error	26	18.3478	0.7054			
Total	53	148.7135				

C.V = 3.974481 $r^2 = 0.876623$ Respuesta promedio = 21.13611

Se realizó la prueba de Tukey, presentándose los resultados en el Cuadro 10.

Cuadro 10. Promedios ordenados de la prueba de Tukey al 5% de los rendimientos de zumo

ORDEN	FACTORES		
	A ([] Enzima) a x sig.	B (Temperatura) b x sig.	C (Tiempo) c x sig.
1	a ₃ 21.662 a	b ₃ 21.584 a	c ₁ 21.683 a
2	a ₂ 21.638 a	b ₂ 21.365 a	c ₂ 21.024 ab
3	a ₁ 20.108 b	b ₁ 20.459 b	c ₃ 20.701 b

El análisis se realizó con un $\alpha = 0.05$; apreciándose que el factor A en sus niveles a₃ (0.5 ml. de enzima/ kg. de pulpa) y a₂ (0.3 ml enzima / kg de pulpa) muestra mayor rendimiento superado estadísticamente al nivel a₁; el factor B en sus niveles b₃ (60°C) y b₂ (50°C) muestran un mayor rendimiento superando al nivel b₁(40°C); el factor C en sus niveles c₃ y c₂ (90 , 60 minutos) no muestran diferencias, presentando ambos mayor rendimiento que el nivel c₁ (30 minutos).

Estos resultados concuerdan con los rendimientos reportados en la extracción de jugo de maracuya, en el que se indica que éste se incrementa a medida que aumenta la concentración de enzima, tiempo de hidrólisis e incluso la temperatura de incubación (Días, 1991).

Según Campos, (1994), los tratamientos enzimáticos de la pulpa antes del prensado, son necesarios para la extracción de jugos de frutas ricos en pectina.

La acción mecánica sobre la fruta de un jugo muy viscoso, debido a la pectina, podría dar origen a una masa semigelificada que dificulta la extracción del jugo.

Las enzimas pectolíticas degradan esta estructura gelificada y facilitan la extracción; además favorece la extracción de pigmentos, sabores y aromas, mejorando así las características organolépticas del jugo.

De acuerdo a la prueba de tukey, la concentración de 0.05% y 0.03% son estadísticamente iguales; al igual que la temperatura de 60 °C y 50°C son iguales estadísticamente, y el tiempo de hidrólisis de 30 , 60 y 90 min., Ocupando el primer y segundo lugar respectivamente.

Debido a ello se decidió seleccionar la temperatura de 50°C, ya que a 60°C se empieza a perder algunas características organolépticas como sabor y aroma; en cuanto al tiempo de hidrólisis el tiempo óptimo es de 30 minutos ya que al aplicar más tiempo no vamos a obtener mayor rendimiento.

Con la concentración de enzima se utilizó concentraciones desde 0.01 a 0.05%; demostrándose lo mismo en la prueba de pectina y de yodo de acuerdo a estos resultados se decidió tomar la concentración de 0.01 y 0.03%, considerándose de que estos resultados están dentro de lo recomendado, 0.01 % - 0.03 % (Rhom Enzime, 1978; Quest, 1995).

En el Cuadro 11, se muestran el resumen de los datos experimentales de mayor rendimiento de zumo durante el tratamiento enzimático utilizando Poligalacturonasa cuyos valores se observan en el Anexo C – 1 teniendo como resultado que la concentración de 0.03% fue la más adecuada para este caso; apreciándose que el rendimiento aumentó conforme aumentó el tiempo

de tratamiento enzimático, disminuyendo a la vez el contenido de pectina; este comportamiento presentó un valor máximo para un tiempo de tratamiento enzimático de 90 minutos, con un rendimiento de zumo de 80.09%, después de la operación del prensado.

Los resultados del cuadro 11 fueron analizados estadísticamente mediante un DBCA, análisis de varianza que se muestra en el Anexo (C – 3, C – 4) el cual indica diferencias significativas en la interacción (A x B) por la cual se aplicó la prueba de Tukey con un α 0.05 determinándose que los tiempos de 30, 60 y 90 minutos de tratamiento enzimático fueron iguales, presentando un mayor rendimiento a los 90 minutos a una concentración de a_1 (0.03 %) Novo, (1986); Pélaez (1998), recomiendan dos tratamientos cuando se trata pulpa de manzana con pectinasas, con el fin de obtener el zumo (100 – 200 g / TM, 30 a 60 minutos) y el segundo para clarificar (100 – 200 g/TM), 1 a 2 horas); deduciéndose que se podría dividir el tratamiento realizado, en dos etapas.

Cuadro 11. Rendimiento de zumo de membrillo, empleando diferente tiempo de tratamiento con Poligalacturonasa después del prensado

TIEMPO (minutos)	RENDIMIENTO %	TRANSMITANCIA	PRESENCIA PECTINA	PRESENCIA ALMIDON
0	0.00	26.2	-+	-
30	77.99	66.8	-+	-
60	80.09	78.9	-	-
90	80.82	90.0	-	-

+ Presencia de pectina
- Ausencia de pectina y almidón

El zumo presentó una transmitancia igual a 66.8 % y después de la clarificación a los 60 minutos presentó una transmitancia de 78.9 %.

b. Tratamiento enzimático con Biopectinasa LM

En el Cuadro 12, se presentan los resultados de zumo extraído de pulpa de membrillo, sin diluir y por acción de la enzima Biopectinasa LM, utilizando 100 gramos de pulpa de membrillo pardeado por cada tratamiento, variando la temperatura y tiempo de hidrólisis, como en el caso de la enzima Poligalacturonasa y cuyos resultados se muestran en el Cuadro 12.

En dicho cuadro se presentan los resultados de zumo extraído; apreciándose que el efecto de la enzima es mayor conforme aumenta la concentración y temperatura y de igual manera el rendimiento del zumo aumenta conforme aumenta el tiempo de hidrólisis hasta 60 minutos.

Los resultados del Cuadro 12, fueron analizados estadísticamente mediante un diseño DBCA con arreglo factorial de 3A x 3B x 3C con 2 repeticiones, el análisis de varianza se muestra en el Cuadro 13.

En el Cuadro 13, se puede observar que existe una alta significación estadística entre los tratamientos, tiempo de hidrólisis, (C), las interacciones (B x C) y (A x B x C). Con el fin de seleccionar el tratamiento más adecuado se aplicó la prueba de tukey, presentándose los resultados en el Cuadro 14. El análisis se realizó con un $\alpha = 0.5$, en este cuadro se puede apreciar que la interacción $a_3 \times b_2 \times c_2$ (0.5 ml de enzima/ kg pulpa x 50° C x 60 minutos) presentó el mayor rendimiento de zumo. También se puede apreciar de que los diferentes niveles del factor A ([E]) son iguales estadísticamente; razón por la

Cuadro 12. Rendimiento de zumo extraído por acción enzimática de Biopectinasa LM sobre pulpa pardeada, sin diluir (*)

A [E]	B °C	C min	RENDIMIENTO DEL ZUMO Volumen (ml)	OBS.
[1]	40	30	20.29	--+
[1]	40	60	20.60	-++
[1]	40	90	20.19	+++
[1]	50	30	20.13	-++
[1]	50	60	20.42	-++
[1]	50	90	20.37	+++
[1]	60	30	18.62	-++
[1]	60	60	20.53	+++
[1]	60	90	20.45	+++
[2]	40	30	18.93	--+
[2]	40	60	20.19	-++
[2]	40	90	20.27	-++
[2]	50	30	19.19	+++
[2]	50	60	22.02	-++
[2]	50	90	19.91	+++
[2]	60	30	20.05	-++
[2]	60	60	20.12	+++
[2]	60	90	22.73	+++
[3]	40	30	19.62	-++
[3]	40	60	20.56	+++
[3]	40	90	20.69	+++
[3]	50	30	20.14	+++
[3]	50	60	21.72	+++
[3]	50	90	19.86	+++
[3]	60	30	20.21	+++
[3]	60	60	20.40	+++
[3]	60	90	20.61	+++

- (*) : Promedio de dos repeticiones
 --- : Inestable, alta sedimentación
 --+ : Inestable, regular sedimentación
 -++ : Poco estable, poca sedimentación
 +++ : Estable, muy poca sedimentación
 [1] : Concentración de enzima 0.01% (V/P) 0.1 ml de enzima/1kg de pulpa
 [2] : Concentración de enzima 0.03% (V/P) 0.3 ml de enzima/1kg de pulpa
 [3] : Concentración de enzima 0.05% (V/P) 0.5 ml de enzima/ 1kg de pulpa

Cuadro 13. Análisis de varianza del rendimiento de zumo extraído, por acción de la Biopectinasa LM

FV	GL	SC	CM	Fc	Ft 5%	Sig.
Bloque	1	1.3098	1.3098	4.87	0.0363	*
Tratamiento	27	37.9287	1.4048	5.23	0.0001	**
A [Enzima]	2	0.6153	0.3076	1.14	0.3339	NS
B (Temp.)	2	0.8518	0.4259	1.58	0.2242	NS
C (Tiempo)	2	11.3088	5.6544	21.04	0.0001	**
A*B	4	4.3633	1.0908	4.06	0.0109	*
A*C	4	2.4134	0.6034	2.24	0.0917	NS
B*C	4	7.9825	1.9956	7.43	0.0004	**
A*B*C	8	9.0838	1.1355	4.22	0.0024	**
Error	26	6.9879	0.2687			
Total	53	44.9165				

C.V = 2.550768 $r^2 = 0.844425$ Respuesta promedio = 20.3226

Cuadro 14. Promedios ordenados de la prueba de Tukey al 5% del rendimientos de zumo extraído, por acción de Biopectinasa LM.

ORDEN	FACTORES					
	A ([] Enzima) a x sig.		B (Temperatura) b x sig.		C (Tiempo) c x sig.	
1	a ₃	20.421 a	b ₂	20.416 a	c ₂	20.726 a
2	a ₂	20.376 a	b ₃	20.411 a	c ₃	20.563 a
3	a ₁	20.176 a	b ₁	20.147 a	c ₁	19.684 b

cual se decidió utilizar la menor concentración de enzima es decir el nivel a_1 (0.1 ml enzima x kg pulpa); por lo tanto los niveles seleccionados fueron a_1 , b_2 , c_2 (0.1 ml enzima/ kg pulpa x 50° C x 60 minutos), estos parámetros se encuentran dentro de lo recomendado técnicamente (Rhom Enzyme, 1978; Quest, 1995).

En el Cuadro 15, se muestra el resumen de los datos experimentales de rendimiento de zumo en función a la variación de tiempo y concentración de enzima, durante el tratamiento enzimático, utilizando la enzima Biopectinasa LM cuyos valores se observan en el Anexo C – 2 teniendo como resultados que la concentración de 0.01 % fue la más adecuada para este caso ; apreciándose que el rendimiento de zumo aumentó conforme aumentó el tiempo de tratamiento enzimático, disminuyendo a la vez el contenido de pectina; este comportamiento presentó un valor máximo para un tiempo de tratamiento enzimático de 90 minutos, con un rendimiento de zumo de 80.05%, después de la operación del prensado.

Cuadro 15. Rendimiento de zumo de membrillo, empleando diferente tiempo de tratamiento con Biopectinasa LM después del prensado.

TIEMPO (minutos)	RENDIMIENTO %	TRANSMITANCIA	PRESENCIA PECTINA	PRESENCIA ALMIDON
0	0.00	26.2	+	+
30	79.74	92.7	+	-
60	79.87	94.0	-+	-
90	80.05	96.3	-	-

+ Presencia de pectina
- Ausencia de pectina y almidón.

Los resultados del Cuadro 15, fueron analizados estadísticamente mediante un DBCA, análisis de varianza que se muestra en el Anexo (C – 5, C – 6) el cual indica diferencias significativas en los tratamientos (A y B), aplicándose la prueba de Tukey con un α 0.05 determinándose que los tiempos de 30, 60 y 90 minutos de tratamiento enzimático fueron iguales, presentando un mayor rendimiento a los 90 minutos a la concentración estudiada (0.03 %) Novo, (1986); Pélaez , (1998), discutido anteriormente.

El zumo presentó una transmitancia igual a 92.7 % a los 30 minutos de clarificación y a los 90 minutos una transmitancia de 96.3 %.

Debemos aclarar que al hacer uso de las enzimas (Poligalacturonasa y Biopectinasa LM) a diferentes concentraciones , pudo notarse un incremento en el rendimiento de extracción de los zumos, cuando las temperaturas de incubación superan la temperatura ambiente (30°C).

Se observó que a medida que aumente la temperatura de incubación aumentó el rendimiento en la extracción. Se observó también que , a las diferentes temperaturas y concentraciones usadas, el tiempo de incubación ejerce un efecto directo sobre el rendimiento de extracción de zumo, elevándose el mismo a medida que aumento el tiempo.

La referencia teórica indica que al aumentar la temperatura, la velocidad de reacción aumenta y para casi todas las enzimas un incremento de 10° C duplica o triplica la velocidad de reacción (Schmith – Hebbel y Penacchiotti, 1982).

Por otro lado se sabe que un aumento de la temperatura ocasiona un aumento de la velocidad de reacción según la ecuación de Arrhenius, pero dicho incremento acelera también la inactivación de la enzima debido a su

desnaturalización, por ser ésta de naturaleza proteica (Braverman, 1980).

Las temperaturas usadas en el tratamiento enzimático se encuentran en el rango de trabajo del sistema enzimático (10 – 55°C), motivo por el cual no se observó disminución de su actividad. Igualmente, se evidencia que la acción catalítica de las enzimas usadas cuando las concentraciones de éstas son mayores confirmándose la referencia bibliográfica, que indica que cuando el sustrato se encuentre en exceso, la velocidad de reacción es directamente proporcional a la concentración de enzima (Braverman, 1980)

Otras observaciones que presentaron atención, fueron los resultados de la prueba del alcohol, la que indica cualitativamente, la suspensión blanquecina, si la pectina presente en el zumo ha sido hidrolizado totalmente. Cabe destacar que la prueba de alcohol aprovecha la propiedad de que las sustancias pécticas con más de 8 – 10 unidades de ácido galacturónico son insolubles en etanol al 50 %, y al añadir agua, precipitan en forma de gel Rohm Enzyme, (1978). A diferencia de la prueba de alcohol, la prueba de yodo dio resultado negativo para los tratamientos control (no dio coloración azul ni violeta). Esto descarta la presencia de almidón, aunque no fracciones muy degradadas, que no tiñen con yodo, pero que pueden todavía producir enturbiamiento (Rohm Enzyme, 1978).

En lo que refiere los valores obtenidos en las evaluaciones de transmitancia cuando se realizaron los tratamientos enzimáticos los dos preparados enzimáticos, se encontró que la mayor lectura de transmitancia fue obtenida por el zumo tratado con Biopectinasa (96.3 %), seguida por el zumo tratada con Poligalacturonasa (90 %).

3. Diagrama de flujo final y balance de materia

Para la obtención del zumo se utilizaron los parámetros que produjeron mayor rendimiento de zumo durante el tratamiento enzimático, los cuales fueron: Poligalacturonasa (E.C 3.2.1.15) al 0.03 ml/100 gr de pulpa; durante 60 minutos y a 50° C. Además se tuvo en cuenta la prueba del yodo y del alcohol (despectinación). Seleccionándose de esta manera el tratamiento que produjo el zumo más estable, con un rendimiento de 82.03 % hasta la operación de envasado y almacenamiento. Este rendimiento está expresado en pulpa de membrillo y peso de zumo (P/P)

a. Diagrama de flujo y balance de materia

En la Figura 14,15, se muestran las operaciones y el balance de materia a partir de pulpa acondicionada para la obtención de zumo de membrillo por hidrólisis enzimática de la pulpa; con los respectivos parámetros tecnológicos en cada operación.

El balance de materia que se muestra en base a 100 kg de pulpa acondicionada.

b. Rendimiento

En el Cuadro 16, 17; se muestran los rendimientos obtenidos por cada operación, teniendo como base 100 kg de materia prima, el menor rendimiento por operación se obtuvo durante el pelado con 87.90 %, seguido del prensado con 96.37 %, para la pulpa que fue tratada con Poligalacturonasa; mientras la que fue tratada con la Biopectinasa LM presentó en la operación de pelado 88.55 %, seguida del prensado con 96.40 %.

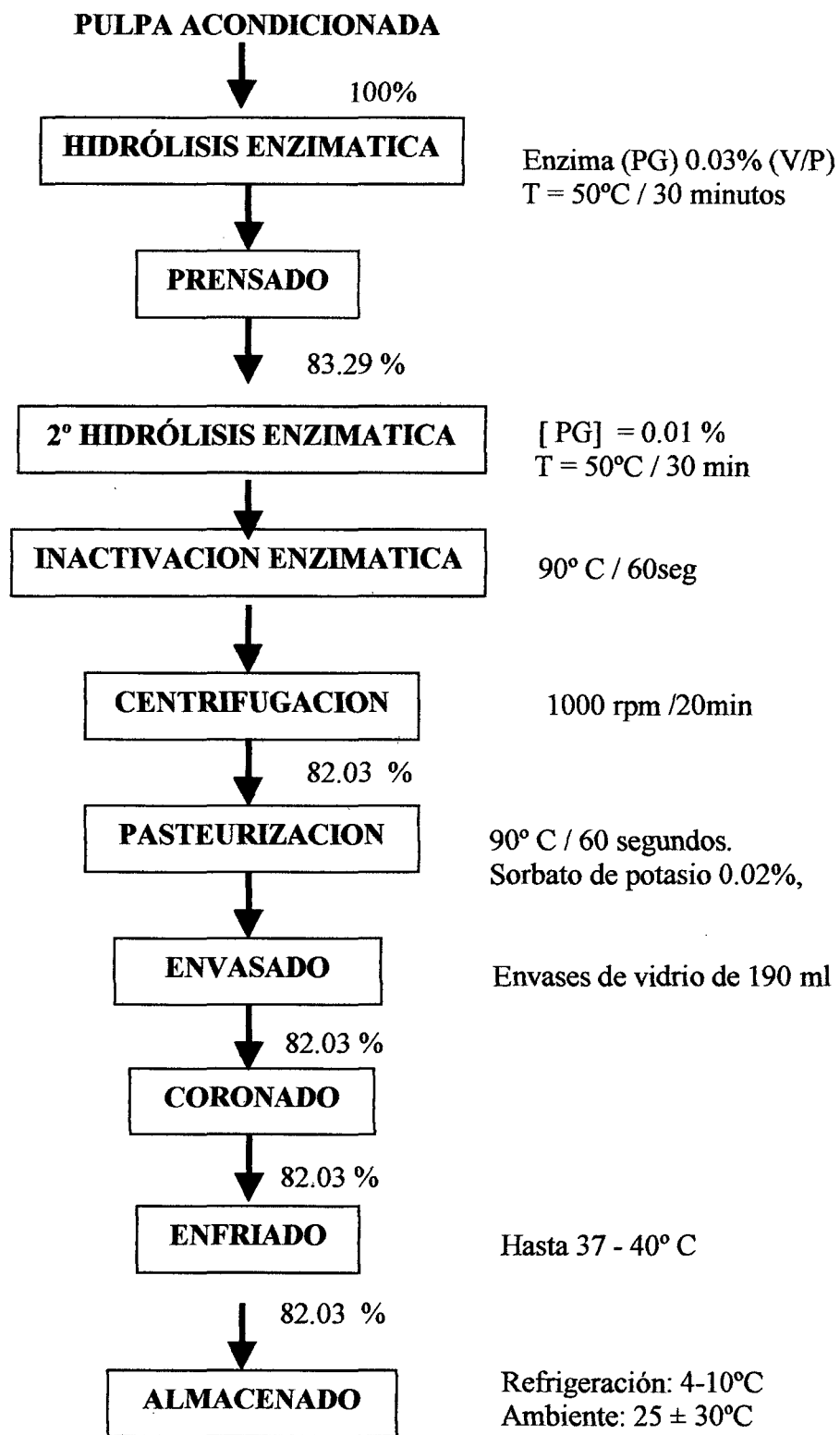


Figura 14. Flujograma de bloques para la obtención de zumo de membrillo, mediante hidrólisis enzimática de la pulpa con Poligalacturonasa.

Cuadro 16. Balance de materia y rendimiento por operación durante la obtención de zumo de membrillo con PG, base 100 kg de pulpa.

OPERACIONES	MATERIA QUE INGRESA (Kg.)	MATERIA QUE SALE (Kg.)	MATERIA QUE CONTINUA (Kg.)	REND. X OPERAC. (%)
Pesado	100.00	-	100.00	100.00
Selección	100.00	-	100.00	100.00
Lavado	100.00	-	100.00	100.00
Pelado	100.00	11.45	88.55	88.55
Pulpeado	88.55	3.16	85.39	96.43
1º Hidrólisis Enz.	85.39	-	85.39	100.00
Prensado	85.39	3.10	82.29	96.37
2º Hidrólisis Enz.	82.29	-	82.29	100.00
Inactivación Enz.	82.29	0.26	82.03	100.00
Centrifugado	82.29	-	82.03	99.68
Pasteurizado	82.03	-	82.03	100.00
Envasado	82.03	-	82.03	100.00
Coronado	82.03	-	82.03	100.00
Enfriado	82.03	-	82.03	100.00
Almacenado	82.03	-	82.03	100.00

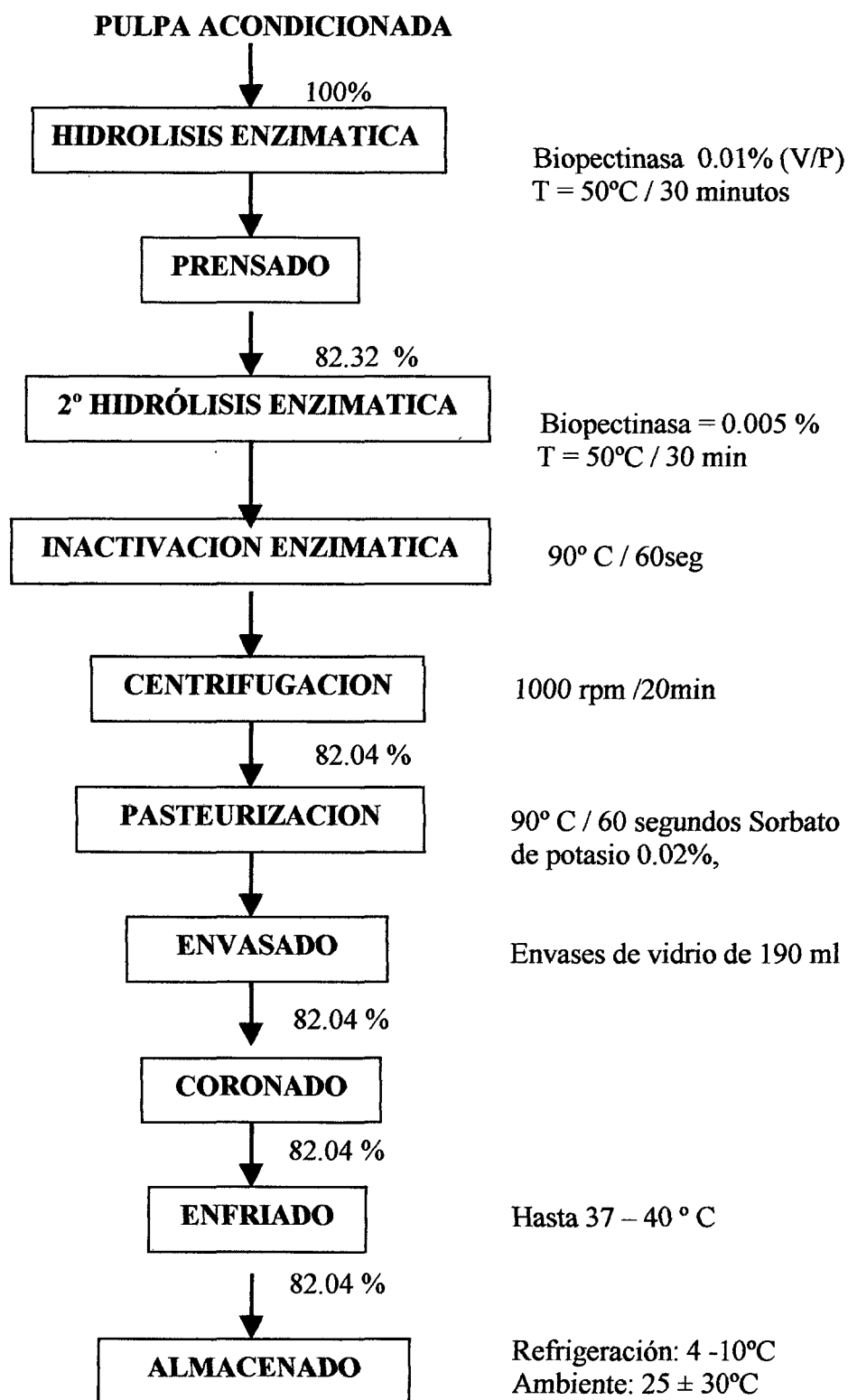


Figura 15. Flujograma de bloques para la obtención de zumo de membrillo, mediante hidrólisis enzimática de la pulpa con Biopectinasa LM.

Cuadro 17. Balance de materia y rendimiento por operación durante la obtención de zumo de membrillo, con Biopectinasa LM.

OPERACIONES	MATERIA QUE INGRESA (Kg.)	MATERIA QUE SALE (Kg.)	MATERIA QUE CONTINUA (Kg.)	REND. X OPERAC. (%)
Pesado	100.00	-	100.00	100.00
Selección	100.00	-	100.00	100.00
Lavado	100.00	-	100.00	100.00
Pelado	100.00	11.45	88.55	88.55
Pulpeado	88.55	3.16	85.39	96.43
1° Hidrólisis Enz.	85.39	-	85.39	100.00
Prensado	85.39	3.07	82.32	96.40
2° Hidrólisis Enz.	85.39	-	82.32	100.00
Inactivación Enz.	82.32	-	82.32	100.00
Centrifugado	82.32	0.28	82.04	99.66
Pasteurizado	82.04	-	82.04	100.00
Envasado	82.04	-	82.04	100.00
Coronado	82.04	-	82.04	100.00
Enfriado	82.04	-	82.04	100.00
Almacenado	82.04	-	82.04	100.00

Se han reportado rendimientos en jugos mayores de 60% después de hidrolizar pulpa de frutas con enzima pectolíticas (Cheffet 1980; Dias 1991).

Viquez (1979) citado por Soto, (1992), reporta que utilizando enzimas pectolíticas se han obtenido los mayores rendimientos de zumo, 60% sobre el peso de la pulpa y de 35 – 45 % sobre el peso de la fruta entera; los rendimientos que se obtuvieron después de la centrifugado fueron de 82.03 % y 82.04 %, cuando se utilizaron las enzimas Poligalacturonasa y Biopectinasa LM rendimientos que son superiores a lo indicado bibliográficamente.

D. VISCOSIDAD DE LA PULPA Y DEL ZUMO

La Figura 16, muestra la variación de la viscosidad durante el tratamiento enzimático a 50° C y con 0.03 % de enzima Poligalacturonasa, pudiéndose apreciar que esta disminuyó conforme transcurrió el tiempo, observándose este comportamiento por ejemplo cuando se trabaja a velocidades de 6 rpm presentando una viscosidad inicial de 12000 mPa.s, llegando hasta 4800 mPa.s después del tratamiento enzimático. Ver Anexo D-1

En la Figura 17, se presentan los diagramas reológicos de la pulpa de membrillo antes y después del tratamiento enzimático ambos a 28 ° C; cuyos resultados se muestran en el Anexo D-3, donde se aprecia en ambos casos las respectivas ecuaciones representativas, cuyos índices de flujo (n) presentan valores de 0.1914 y 0.2773 respectivamente, este comportamiento corresponde a un fluido seudoplástico, ya que $0 < n < 1$.

Existiendo alimentos con comportamiento similares, como el puré de manzana con un

$n = 0.30$ a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, puré de plátano con un $n = 0.283$ a $22\text{ }^{\circ}\text{C}$, jugo de naranja concentrado con un $n = 0.585$ a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Steffe, 1992; Rao, 1988).

Se conoce que la mayoría de los derivados de frutas son sistemas bifásicos compuestos

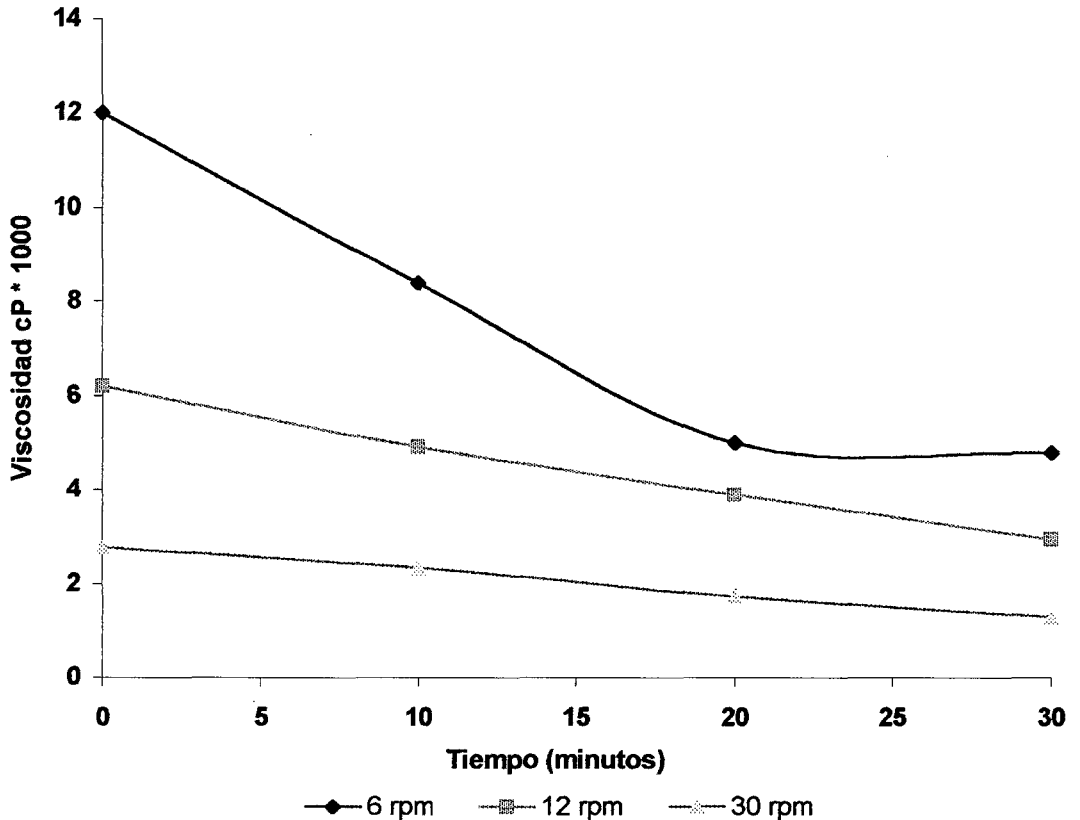


Figura 16. Variación de la viscosidad de la pulpa de membrillo por acción de la Poligalacturonasa (PG)

de partículas sólidos, dispersas en un medio acuoso, esta fase dispersante es una disolución acuosa de sólidos de bajo peso molecular (azúcares, sales y ácidos orgánicos) y alto peso molecular (pectinas), las pectinas imparten un comportamiento no newtoniano (Carbonell, 1990).

En la Figura 17, se observa que la pulpa después del tratamiento enzimático requiere

un menor esfuerzo de corte para presentar casi la misma velocidad de deformación, esto está relacionado con el rompimiento de las cadenas de pectina, las que inicialmente forman con los agregados de pulpas una estructura reticular, que al romperse producen que la pulpa se disgregue en partículas más pequeñas con menor capacidad para ligar agua, provocando así la pérdida de la plasticidad y de la consistencia del producto (Carbonell, 1990).

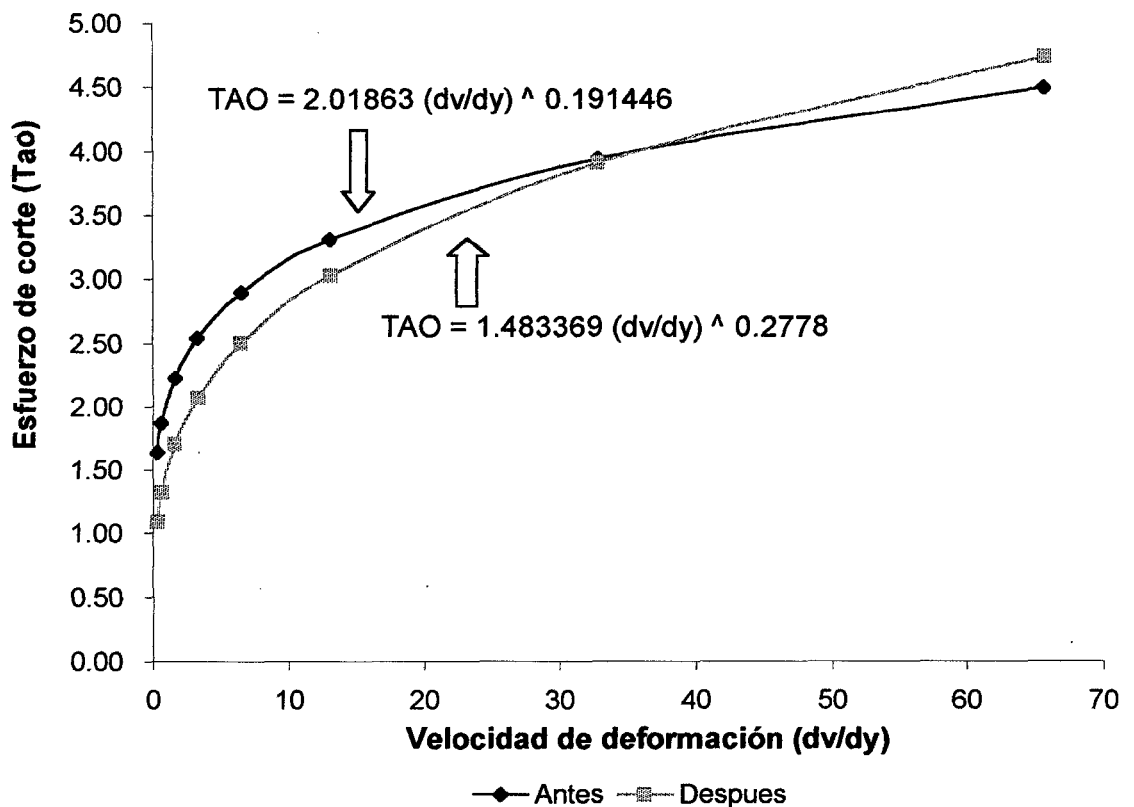


Figura 17. Diagrama reológico de la pulpa de membrillo, antes y después del tratamiento enzimático con (PG)

El índice de consistencia (m), antes del tratamiento enzimático es igual a 2.0186 Pa.sⁿ, y después del tratamiento 1.4834 Pa.sⁿ, esta reducción del índice de consistencia de la pulpa de membrillo, coincide con el tratamiento del índice del puré de albaricoque, el cual disminuye cuando los materiales pécticos son así degradados enzimáticamente (Rao,1978).

Finalmente podemos decir que la pulpa de membrillo, antes y después del tratamiento enzimático muestra reológicamente una marcada relación con la ley de la potencia dado los coeficientes de correlación obtenidos. Pudiendo indicarse, que la pulpa de membrillo es un fluido no newtoniano y pseudoplástico, tanto antes como después del tratamiento enzimático.

La viscosidad del zumo extraído fue determinada utilizando el viscosímetro capilar Cannon – Fenske N° 100 cuyo factor es: 0.015 centiestokes/seg; determinándose que la viscosidad del zumo es de 1.99 centiestokes. Con el fin de comparar la viscosidad en centipoise (mPa.s) se determinó la densidad del zumo, la cual fue de 1.074 gr./cm³ con la cual se determinó que la viscosidad es igual a 2.2017 centipoise (mPa.s), cuyo valor es mucho menor a la viscosidad encontrada en la pulpa tratada enzimáticamente. En la Figura 18, se muestra la variación de la viscosidad, durante el tratamiento enzimático con Biopectinasa LM; pudiéndose apreciar que esta disminuyó conforme transcurre el tiempo, observándose claramente cuando se trabaja a velocidades bajas por ejemplo 6 rpm.; presentando una viscosidad inicial de 12,300 mPas, llegando hasta 3,900 mPas después del tratamiento enzimático. Ver Anexo D- 2.

En la Figura, se observa que en los primeros 15 minutos la reducción de la viscosidad es muy notoria, constituyendo así una primera etapa, comprobando lo reportado bibliográficamente (Gist –Brocades, 1991 ; Viquez, 1981).

En la Figura 19, se presentan los diagramas reológicos de la pulpa de membrillo, antes y después del tratamiento enzimático; mostrándose en ambos casos las respectivas ecuaciones, donde se aprecian los índices de flujo (n) con valores de 0.1679 y 0.1750 respectivamente este comportamiento reológico corresponde a un fluido tipo pseudoplástico, ya que $0 < n < 1$; existiendo alimentos con comportamiento similares (Steffe, 1992; Rao, 1986 y Carbonell, 1990).

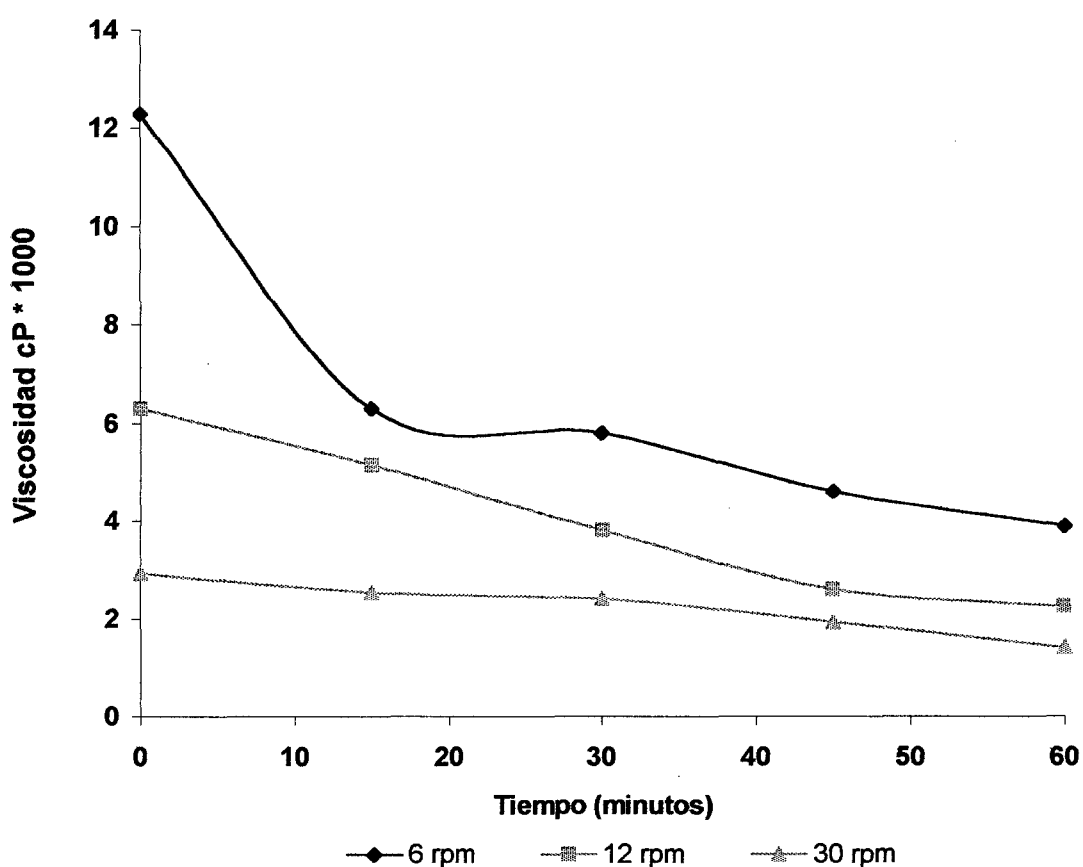


Figura 18. Variación de la viscosidad durante el tratamiento enzimático con Biopectinasa LM.

El índice de consistencia (m), antes del tratamiento enzimático fue igual a $2,2216 \text{ Pa.s}^n$ y después del tratamiento de 1.8377 Pa.s^n ; esta reducción del índice de consistencia coincide con el comportamiento del caso anterior (Rao, 1978).

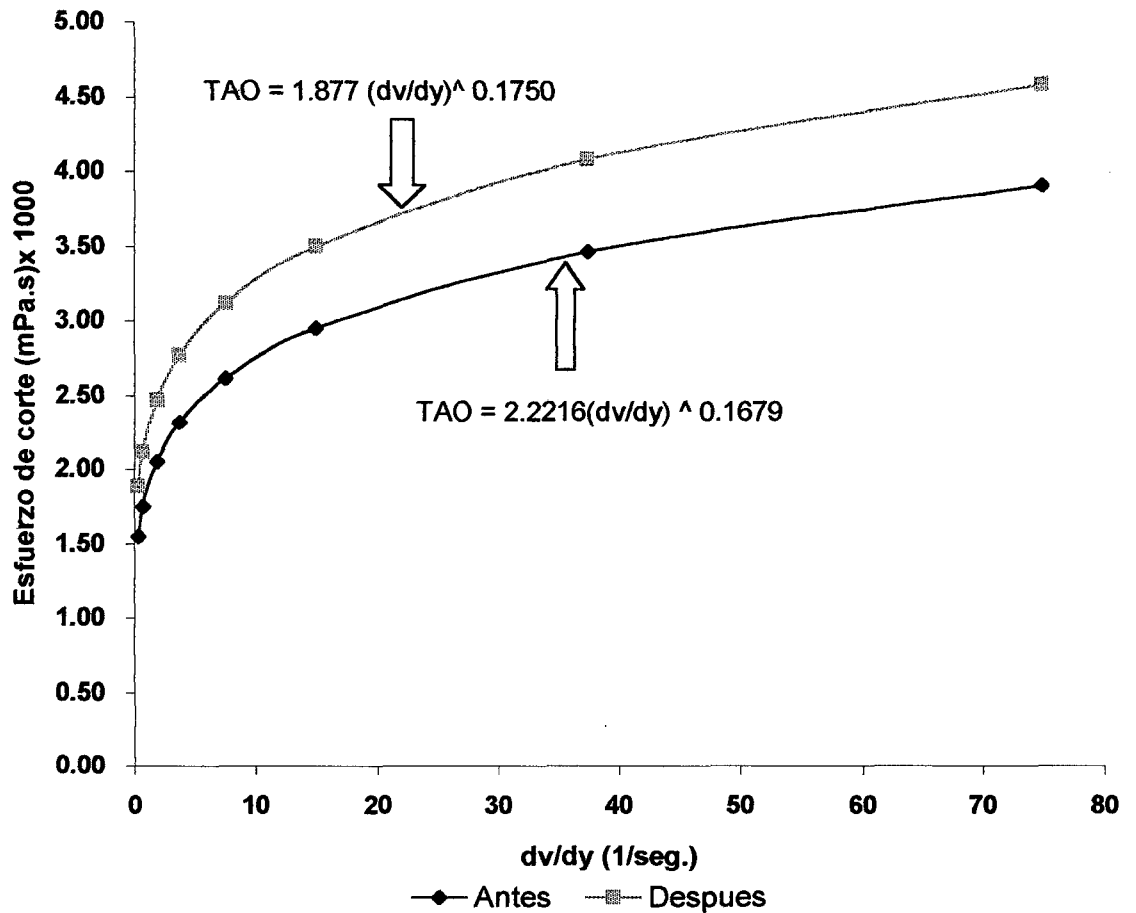


Figura 19. Diagrama reológico de la pulpa de membrillo, antes y después (Biopectinasa)

Finalmente se puede decir que la pulpa de membrillo, antes y después del tratamiento enzimático, muestra reológicamente, una marcada relación con la ley de la potencia (Power Law), dados los coeficientes de correlación obtenidos.

Pudiéndose indicarse que la pulpa de membrillo al ser tratada con la enzima Biopectinasa tiene un comportamiento no Newtoniano y pseudoplástico, tanto antes como después del tratamiento enzimático.

La viscosidad del zumo extraída fue determinado utilizando el viscosímetro capilar Cannon Fenske N° 100, determinándose que la viscosidad del zumo es de 2.02 centiestokes.

E. CARACTERIZACION DEL ZUMO Y ALMACENAMIENTO

Se almacenó durante 90 días, realizándose evaluaciones cada 30 días, los resultados de los análisis físico químico, análisis sensorial y microbiológico se muestran en los Cuadros 18, 19,20 ,21 y 22

1. Análisis físico químico

En el Cuadro 18, se observa que el pH, durante el almacenamiento experimenta una mínima variación en ambas temperaturas (ambiente y refrigeración) acentuándose después de los 30 días.

La acidez titulable del zumo almacenado a refrigeración no experimentan cambio significativos ; en tanto a la temperatura ambiente se nota un aumento según; Braverman, (1980), esto es debido a la disociación de los ácidos por efecto de la temperatura.

Se observa que el contenido de la vitamina C, experimenta una notable disminución durante el almacenamiento Según Badui, (1984) el ácido ascórbico es muy lábil e inestable y puede ser degradada por muchas vías; siendo la oxidación y la degradación térmica los más importantes; la degradación de la vitamina C a temperatura ambiente es más rápida debido a la presencia de

oxígeno, acción de la luz, de algunos metales, siendo más estables a pH bajos (Belitz, 1988).

Los azúcares reductores experimentan un incremento, esto debido a la “inversión de la sacarosa”, mediante el cual éste disacárido se hidroliza bajo la acción de los ácidos débiles en sus componentes fructosa y glucosa, siendo estos dos últimos los responsables del pardeamiento no enzimático ya que presentan el grupo carbonilo libre muy reactivo (Fennema, 1993).

Chefftel, (1980); manifiesta que la sacarosa sufre un proceso de hidrólisis lo que está favorecido por el pH ácido, la temperatura y el tiempo, produciéndose durante el almacenamiento. De esta forma el pardeamiento influye negativamente en la transparencia del zumo.

Respecto al análisis de las muestras almacenadas a temperatura de refrigeración (4° C), la variación de la transmitancia es mínima, esto estaría ocasionado por la presencia de algunas proteínas que influyen en la turbidez de las bebidas almacenadas en frío (Belitz, 1988)

Respecto a la viscosidad se puede apreciar que no mostró cambio alguno, durante el almacenamiento; lo cual indica que no hay presencia de enzima residual el mismo que fue inhibido durante el tratamiento térmico.

En el Cuadro 19 se observa que los sólidos solubles, pH no experimentaron cambios significativos tanto en las muestra almacenadas en refrigeración, como las almacenadas a temperatura ambiente.

El contenido de vitamina C experimentó una notable disminución en las muestras almacenadas a temperatura ambiente, afirmándose lo expuesto anteriormente en el Cuadro 18 (Badui , 1984 ; Fennema, 1993).

Cuadro 18. Análisis físico químico del zumo de membrillo obtenido con Poligalacturonasa durante el almacenamiento.

COMPONENTES	TEMP. ° C	DÍAS DE ALMACENAMIENTO			
		0	30	60	90
Sólidos solubles	A	12	12	12	12
°Bx a 20°C	R	12	12	12	12
PH	A	3.4	3.4	3.5	3.5
A 20° C	R	3.4	3.4	3.5	3.4
Acidez total	A	0.425	0.474	0.478	0.474
gr ácido málico/100ml	R	0.425	0.422	0.474	0.474
Vitamina C	A	11.520	10.128	7.334	6.263
mg ác. Asc.red/ 100ml.	R	11.520	10.43	8.0257	6.275
Azúcares reductores	A	8.977	9.120	9.194	10.077
gr glucosa / 100ml.	R	8.977	9.037	9.090	10.111
Azúcares totales	A	9.957	9.932	10.486	11.253
gr glucosa / 100ml.	R	9.957	9.923	10.468	10.468
Viscosidad	A	1.99	1.99	1.99	1.99
centistokes	R	1.99	1.99	1.99	1.99
Intensidad de color	A	0.237	0.319	0.310	0.310
abs. A 230 nm.	R	0.237	0.233	0.233	0.260
Turbidez	A	96	95.30	93.20	94
Abs. A 660 nm.	R	96	94	81	88.50

R: A temperatura de refrigeración, 4 °C.

A: A temperatura ambiente, 25 °C.

Cuadro 19. Análisis físico químico del zumo de membrillo obtenido con Biopectinasa LM durante el almacenamiento.

COMPONENTES	TEMP. ° C	DÍAS DE ALMACENAMIENTO			
		0	30	60	90
Sólidos solubles	A	12	12	12	12
°Bx a 20°C	R	12	12	12	12
PH	A	3.4	3.4	3.5	3.4
A 20° C	R	3.4	3.4	3.5	3.4
Acidez total	A	0.425	0.469	0.473	0.462
gr ácido málico/100ml	R	0.425	0.422	0.449	0.449
Vitamina C	A	11.520	10.279	7.152	6.275
mg ác. Asc.red/ 100ml.	R	11.520	10.51	11.376	7.855
Azúcares reductores	A	8.977	8.998	9.084	9.678
gr glucosa / 100ml.	R	8.977	8.979	9.092	10.081
Azúcares totales	A	9.957	9.953	10.496	11.253
gr glucosa / 100ml.	R	9.957	9.906	10.496	10.496
Viscosidad	A	1.99	2.02	2.02	2.02
centistokes	R	1.99	2.02	2.02	2.02
Intensidad de color	A	0.237	0.260	0.244	0.237
abs. A 230 nm.	R	0.237	0.248	0.236	0.229
Turbidez	A	96	95	94	92
abs. A 660 nm.	R	96	97	96.80	94

R: A temperatura de refrigeración, 4 °C.

A: A temperatura ambiente, 25 °C.

También podemos notar que el zumo almacenado a temperatura de refrigeración es más estable y pierde menos vitamina C que el almacenado a temperatura ambiente.

En cuanto a los azúcares reductores se puede apreciar que hay un ligero incremento; Esto debido a la inversión de la sacarosa (Fennema, 1993).

La sacarosa sufre un proceso de hidrólisis lo que esta favorecido por el pH ácido, la temperatura el tiempo, produciéndose espontáneamente durante el almacenamiento (Chefftel y Chefftel, 1980).

También se observa que la intensidad de color, turbidez y viscosidad no muestran cambios significativos, durante el almacenamiento.

2. Análisis microbiológico

En el Cuadro 20, se muestra los resultados del análisis microbiológico, donde se observa que los zumos almacenados a temperatura ambiente y refrigeración, no presentan presencia de microorganismos aerobios viables, mohos, levaduras y lactobacillus, lo que confirma la efectividad del pasteurizado, la acción del preservante (sorbato de potasio) y la hermeticidad del envase que no permiten contaminación; aunque se sabe que es frecuente encontrar mohos y levaduras en zumos de frutas (Mossell, 1985).

Cuadro 20. Análisis microbiológico del zumo de membrillo obtenido con Poligalacturonasa y Biopectinasa LM, durante el almacenamiento

DETERMINACIÓN	TEMP. °C	DÍAS		
		0	30	90
Numeración de m.o aerobios, mesófilos viables (*)	1 A	-	-	-
	2 R	-	-	-
	3 A	-	-	-
	4 R	-	-	-
Numeración de mohos y levaduras (*)	1 A	-	-	-
	2 R	-	-	-
	3 A	-	-	-
	4 R	-	-	-
Numeración de Lactobacilos (*)	1 A	-	-	-
	2 R	-	-	-
	3 A	-	-	-
	4 A	-	-	-
		-		

(*) : u.f.c./ml
 - : Negativo (< 1/ml)
 R : Temperatura de refrigeración
 A : Temperatura ambiente

3. Análisis sensorial

La evaluación sensorial se realizó después de 90 días de almacenamiento, los resultados de los puntajes dados para cada panelista, para las 2 muestras, se encuentran en los Cuadros 21 y 22, de acuerdo a cada tributo evaluado.

Estos resultados fueron calificados mediante una escala hedónica de 9 puntos y con 18 panelistas semi entrenados para ambas muestras; el zumo obtenido con enzima Poligalacturonasa presentó un calificativo menor que el zumo obtenido con Biopectinasa LM. Considerando el promedio de cada atributo, por lo que se debe indicar que la tratada con Biopectinasa tiene mayor aceptabilidad.

Según los puntajes promedios obtenidos para los atributos sabor y aroma, las muestras presentaron un calificativo de bueno ; en cuanto al color presentan un amarillo claro y la transparencia moderadamente translúcida.

Cuadro 21. Resultados de la evaluación sensorial del zumo de membrillo obtenido con Poligalacturonasa y almacenado.

PANELISTAS	ATRIBUTOS			
	Sabor	Aroma	Color	Transmitancia
1	7	8	7	7
2	8	8	8	5
3	8	8	8	8
4	8	8	7	8
5	8	7	8	8
6	6	9	8	8
7	6	8	7	7
8	7	7	7	7
9	7	8	8	7
10	9	9	8	8
11	8	8	9	7
12	7	8	8	7
13	8	8	8	7
14	8	8	8	7
15	6	8	8	8
16	7	9	8	8
17	8	8	8	7
18	8	9	8	8
X	7.44	8.11	7.83	7.33

Cuadro 22. Resultados de la evaluación sensorial del zumo de membrilloobtenido con Biopectinasa LM y almacenado.

PANELISTAS	ATRIBUTOS			
	Sabor	Aroma	Color	Transmitancia
1	8	8	7	7
2	9	9	8	7
3	7	8	9	8
4	8	8	8	8
5	8	8	8	8
6	8	9	8	8
7	8	8	8	7
8	8	8	8	7
9	7	8	8	8
10	8	8	9	8
11	8	7	8	7
12	8	8	8	8
13	9	8	8	7
14	7	7	8	8
15	8	9	8	8
16	9	8	8	8
17	8	8	8	8
18	8	8	8	8
X	8.44	8.06	8.05	7.67

V. CONCLUSIONES

1. Mediante el estudio se determinó que la pulpa de membrillo con un índice de madurez de 30.20 % presentó mejores condiciones para la obtención de zumo, caracterizándose por contar un 82.7 % de humedad y 17.9 % de carbohidratos, con presencia de los demás componentes en pequeñas cantidades.
2. Se determinó los parámetros de la actividad de la Poligalacturonasa (PG) siendo esta de 374.44 U/ml y la Biopectinasa se caracterizó por presentar actividad como poligalacturonasa (390.72 U/ml), como Pectinesterasa (32.86 UPE/ml), como Pectinliasa (21.29 UPL/ml) y como celulasa (9.25^{-3} U/ml).
3. Cuando se utilizó la enzima Poligalacturonasa (0.03 %, 50 ° C, 30 minutos de hidrólisis) se obtuvo un rendimiento de 82.03 % en función al peso de la pulpa y cuando se utilizó la enzima Biopectinasa LM (0.01 %, 50 ° C, 60 minutos de hidrólisis) se obtuvo un rendimiento de 82.04 %.
4. La pulpa antes y después del tratamiento enzimático se caracterizó reologicamente por ser fluidos que presentaron un comportamiento Pseudoplástico con pérdida del índice de consistencia (m) de 2.0186 Pa.sⁿ á 1.4834 Pa.sⁿ cuando se utilizó la enzima Poligalacturonasa y 2.2216 Pa.sⁿ á 1.8377 Pa.sⁿ cuando se empleo la enzima Biopectinasa LM.
5. El zumo durante el almacenamiento de 90 días, no experimentó cambios significativos en sus características físico químico y microbiológicos siendo más estable el almacenado a condiciones de refrigeración.
6. Mediante la evaluación sensorial se determinó que el zumo de membrillo tiene buena aceptación y buena características organolépticas.

VI. RECOMENDACIONES

- 1. Realizar estudios a nivel piloto o industrial, para la elaboración de otros productos derivados del membrillo, tales como: sidra, vinagre, machacado, puré, néctar, etc.**
- 2. Investigar la eficiencia de otras marcas de enzimas para la extracción de zumo de membrillo.**
- 3. Realizar un estudio de costos para la elaboración industrial de membrillo, con el fin de determinar la factibilidad económica.**
- 4. El zumo obtenido puede ser consumido directamente como bebida, concentrados o, a partir de éste último un jarabe con alto contenido de azúcares.**

VII. BIBLIOGRAFIA

1. ADRIAN, J.; FRANGNE, R. 1990. La ciencia de los alimentos de la A a la Z, Ed. Acribia S.A. Zaragoza, España. 317 p.
2. ANZALDUA, M. A. 1994. La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y la práctica. Edición Acribia. Zaragoza, España. 198.p.
3. A.O.A.C. 1984. Official methods of analysis of the association of official analytical chemists. 10 edición. EEUU.
4. A.O.A.C. 1997. Official methods of analysis of the association of official analytical chemists. 16 edición. Vol. I y II. EEUU.
5. ATKINSON, B.; MAVITUNA, F. 1985. Biochemical engineering and biotechnology handbook. Ed the Nature Press. EEUU y Canada. pp 465 – 477.
6. BADUI, S.D. 1984. Química de los alimentos. 3a edición. Editorial. Alhambra S.A.; México. 648 p.
7. BARBOZA-CANOVAS, G.; IBARZ, A.; PELEG, M. 1993. Propiedades reológicas de alimentos fluidos. Revisión In Alimentaria, Abril. pp 39 – 89.
8. BELITZ, H.; GROSCH, W. 1988. Química de los alimentos. Editorial. Acribia S.A. Zaragoza, España. 813 p.
9. BEN-SHALOM, N. Et al. 1986. Pectolytic enzymes studies for pecting of grapefruit segment membrane J. Food Sci. 51 (2). pp 421 – 423.
10. BERRUETA, J. et al. 1992. Utilización de enzimas en la industria alimentaria. Rev. Alimentación, equipos y tecnología 11(12) pp 79 – 81.
11. BRAVERMAN, J. B. 1980. Introducción a la bioquímica de los alimentos. Trad. Q. I Fernando A. Hill. Editorial. Manual Moderado México. 358 p.
12. BRITO DE LA FUENTE. 1995. Memorias del curso. Reología y su aplicación al

procesamiento de alimentos..Julio 4 al 7. México.

13. CAMPOS, G. B. 1993. Aplicaciones biotecnológicas en el procesamiento de frutas y vegetales. U.N.A. La Molina. Lima.
14. CAMPOS, G. B. 1994. Uso de enzimas en la Industria Alimentaria. U.N.A. La Molina. Lima - Perú
15. CHARLEY, H. 1991. Tecnología de los alimentos. Editorial. Limusa. 767 p.
16. CHEFTEL, J. C.; CHEFTTEL, H. 1980. Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos. Editorial. Acribia. Zaragoza. España.
17. CHAMORRO, P.; SOBRAL; ALZAMORA. 1996. Análisis cinética, termodinámica y estructural de los cambios producidos durante el procesamiento de alimentos Tomo II Valencia, España. 580 p.
18. COLLAZOS, C. C. et al. 1993. La composición de los alimentos de mayor consumo en el Perú. 6ª edición. Ministerio de salud. Instituto Nacional de Nutrición. Lima – Perú.
19. CRUEGER, W.; CRUEGER, A. 1993. Biotecnología, Manual de microbiología industrial. Ed Acribia. Zaragoza. España. pp 231-245.
20. DIAS, R. A. T. 1991. Uso de enzimas en el procesamiento de jugo de maracuyá (*passiflora edulis*). Tesis Industrias Alimentarias. UNA La Molina. Lima – Perú. 86 p.
21. DUCKWORTH, 1968. Frutas y verduras Editorial Acribia, Zaragoza España. 680p.
22. DZIEZAK, J. D. 1991. Enzymes: Catalysts for food Processes. Food Technol. Enero pp. 77 - 85.
23. FELLOWS, F. 1994. Tecnología del procesamiento de los alimentos. Principios y practicas. Editorial. Acribia. Zaragoza, España. 550 p.

24. FENNEMA, O. R . 1993. Química de los alimentos. Editorial. Acribia S.A. Zaragoza. España 1070 p.
25. FURIA, T. 1972. CRC Handbook of food additives. 2ª edición. Editorial CRC Press, Inc. Vol I. New York. EE.UU. pp 27 - 52
26. GARCIA, G.; QUINTERO,R.: LOPEZ – MUNGUÍA, C. 1993. Biotecnología alimentaria. Editorial Limusa. S.A. México, 636 p.
27. GACESA, P.; HUBBE, J. 1991. Tecnología de enzimas. Editorial. Acribia S.A. Zaragoza. España. 206 p.
28. GEANKOPLIS, C. 1995. Procesos de transporte y operaciones unitarias. 2ª edición. Cia. Editorial Continental, S.A. México.
29. GIST BROCADES. 1991. Rapidace C 80. Información técnica. Food Ingredients Division. Seclin Cedex. Francia.
30. GORDON, M.; MACRAE, R. 1987. Instrumental analysis in the biological sciences. Ed Blakie. Great Britain. pp. 92 - 116.
31. GRIEVE, M. 1997. A modern herbal botanical. Com (internet) 4 p.
32. HART, F. L.; FISHER, H. 1994. Análisis moderno de los alimentos. Trad. Por Dr. Justino Burgos Gónzales. Editorial. Acribia. Zaragoza, España. 619 p.
33. ICMSF. 1983. Microorganismos de los alimentos 1. Técnicas de análisis microbiológicos. Editorial. Acribia. Zaragoza. España. 413 p.
34. INDECOPI, 1976. Norma técnica nacional, requisitos generales, ITINTEC 209. Lima-Perú. 3 p.
35. IUPAC, 1987. Measurement of cellulase activities, New Delhi – 110016, India. pp 249 – 260.
36. JAGNOW, D. 1991. Biotecnología, Ed. Acribia, Zaragoza España

37. JOSLYN, M. ; and TRESSLER, D. 1961. Frut and vegetable juice. Processing and technology. Vol. 3, N° 1.
38. LEWIS, M. 1993. Propiedades físicas de los alimentos y de los sistemas de procesado. Editorial. Acribia S.A. Zaragoza, España. pp 101 – 132.
39. MADDEN, D. 1991. In a jam and out of juice. NCBE Newsletter, winter. pp. 1-5.
40. MADRID, 1994. Nuevas normas de calidad de los alimentos. AMV. Edic Mundi-Prensa S.A. Madrid, España
41. MEURENS, M. 1979. Utilisation des cellulase, hemicellulases y pectinases dans les industries alimentaires. En “Utilisation des enzymes dans les industries alimentaires” Institut belge de l'alimentation et nutrition “ I.B.A.N.”, Bruselas.
42. MILLER, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry. 31(3) pp 426 – 428.
43. MITSCHKA, P. 1982. Simple conversion of Brookfield RVT. Readings into viscosity functions. In AR-82, Rheologica acta 21,207. Institute of Chemical Process Fundamentals, Czechoslovak Academy of Sciences, Prague. pp 207 – 209.
44. MONTEIRO, S. 1993. Transformacoes bioquímicas en Curso internacional Poscosecha de frutas y hortalizas, 18 – 27 de octubre de 1993. Universidad Nacional Agraria de la Selva, Tingo María – Perú. pp 19 – 38
45. MOSEEL, D.; MORENO, G. 1985. Microbiología de los Alimentos. Editorial. Acribia S.A. Zaragoza, España. 375 p.
46. MULLER, H. G. 1973. Introducción a la reología de los alimentos, Editorial Acribia Zaragoza (España). 169 p.
47. MUÑOZ, C. F. 1967. Estudio preliminar del cultivo del membrillero y de su status nutricional en el país. Tesis de grado. UNA. Lima-Perú.

48. NELSON, P.; TRESSLER, D. 1980. Fruit and vegetable juice processing technology. 3a edición. Editorial AVI Publishing company. E.E.U.U. pp 413 - 414.
49. NEUFELD, E. Et al. 1968. Methods in Enzymology, complex carbohydrates. Ed. Academic Press. 2ª edición. EE.UU. pp 628 – 641.
50. NOVO INDUSTRIAS ENZYMES DIVISION BAGSVAERD. 1986 Novo's Handbook of practical biotechnology. Edited by C.O.L. Boyce. 125 p.
51. OSORIO, L. 1990. Reología en alimentos. I parte: Aspectos reológicos de alimentos fluidos. In alimentos N° 4, volumen 15. pp 33 – 36.
52. PELAEZ, S. P. 1998. Estudio del tratamiento enzimático y viscosidad de la pulpa de plátano tipo seda (*Musa acuminata*) en la Obtención de jarabe. Tesis grado Magister. Industrias Alimentarias, UNA La Molina. Lima – Perú.
53. PEARSON, D. 1981. Técnicas del laboratorio para el análisis de los alimentos. Edición Acribia S.A. Zaragoza – España.
54. PILNIK, W.; ROMBOUITS, F. 1978. Pectic enzymes. Department of Food Science, agricultural University, wageningen. The Netherlands. pp 109 – 126.
55. PONCE, R. F. C. 1996. Obtención de jugo de papaya (*carica papaya*), utilizando enzimas pectolíticas. Tesis. Ing. Ind. Alimentarias. UNAS. Tingo María.
56. TAMARO, D. 1936. Tratado de fruticultura. Membrillero. G. Gili. España.
57. QUEST INTERNACIONAL. 1978. Hoja Técnica Biopectinase – LM, General description.
58. QUINTERO, R. R. 1987. Ingeniería bioquímica. Editorial Alhambra S.A de C.V. México. 332 p.
59. RANGANA, S. 1979. Manual of analysis of fruit and vegetable products. 2ª Impresión de . McGraw-Hill Published Company Limited. New Delhi. pp 21-54

60. RAMETTE, R. 1983. Equilibrio y análisis químico. Ed. Fondo educativo Interamericano S. A. EE.UU. pp 134 –169.
61. ROHM ENZYME. 1978. Technical information 1.1.1. Tratamiento enzimático de la pulpa de manzana. Diciembre Kirschenallee, Postfach 4242.
62. ROHM ENZYME. 1979. Technical information 1.0. Test de Alcohol para controlar restos de pectina en zumos de fruta. Diciembre. Kirschenallee, Postfach 4242.
63. ROHM ENZYME. 1980. Technical information 1.1.1. Test with free – run juice to evaluate pressability of apple mash. July. Kirschenallee, Potfach 4242.
64. ROBINSON, D. S. 1991. Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos. Edición Acribia S.A Zaragoza- España.
65. ROYO, I. J. 1977. Contenido de pectina de las fases líquidas y sólidos del zumo de naranja y del extracto acuoso de la corteza. Rev. Agroquímica y Tecnología Alimentaria. 17 (1). pp 79 – 85.
66. SCHMIDT, H. H.; PENNACCHIOTTI, M. I. 1982. Las enzimas en los alimentos. Su importancia en la química y tecnología de los alimentos. Fundación Chile. 93 p.
67. SCRAGG, A. 1996. Biotecnología para ingenieros. Sistemas biológicos en procesos tecnológicos. Edición Limusa S.A. España. Pp 177- 188
68. SCRIBAN, R. 1988. Biotecnología, 2ª edición. Editorial El Manual Moderno. México, D. F. 669 p.
69. SEGEL, I. H. 1982. Cálculos de Bioquímica. Editotial Acribia S.A. Zaragoza – España. 564 p.
70. SHEWFELT, R. L. 1993. Postharvest handing a systems Approach. Ed. Academic Press. Inc. Estados Unidos

71. STEFFE, J. 1992. Rheological methods in food process engineering. Edición Freeman press, Michigan, USA. pp 103 - 113.
72. SOLER, R. 1961. Fruticultura moderna. El membrillero. Buenos Aires.
73. VERTEG, C.; ROMBOUITS, F.; SPAANSEN, C.; PILNIK, W. 1980. Thermostability and orange juice cloud destabiling properties of multiple pectinesterases from orange. In Journal of food science. Vol 45, N° 4. EE. UU. pp 969 – 971.
74. VIQUEZ, F.; LASTRETO, C.; COOKE, R. 1981. A study of the production of clarified banana juice using pectinolytic enzymes. In Journal food technology. Vol. 16, N° 2. EE. UU. pp 115 – 125.
75. WISEMAN, A. 1991. Manual de biotecnología de las enzimas. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza – España. 444 p.

VIII. ANEXOS

ANEXO B

Anexo B-1 Resultados experimentales para la determinación de la actividad enzimática de Poligalacturonasa (PG).

[E] : 0,1 ml PG/5ml.

TIEMPO (minutos)	μMOLES DE GRUPOS ALDEHÍDOS
0,0	0,000
5,0	15,466
*10,0	18,722
15,0	21,978
20,0	21,978

* : Número de puntos experimentales utilizados para obtener la ecuación para este caso.

Mediante el análisis de regresión lineal de la porción recta de la curva, se determinó la actividad enzimática pectolítica que viene representado por la respectiva pendiente, la ecuación representativa se muestra a continuación, las cuales expresan la variación del número de moles de grupos de aldehídos Vs. El tiempo en minutos por acción enzimática.

$$Y = 2.035 + 1.8722 X$$

$$r^2 = 0.9358$$

Utilizando la pendiente de la ecuación que viene hacer μmoles de grupos de aldehídos/ minutos ; se encuentra la actividad de la enzima y convirtiéndolo a enzima original se tiene 374.44 U/ml a pH 5.0 y 30°C

Anexo B-2: Resultados experimentales para la determinación de la actividad enzimática de Biopectinasa LM (PG).

[E] : 0,1 ml PG/5ml.

TIEMPO (minutos)	μMOLES DE GRUPOS ALDEHÍDOS
0,0	0,000
5, 0	14,652
*10,0	19,536
15,0	21,164
20,0	21,978

* : Número de puntos experimentales utilizados para obtener la ecuación para este caso.

Mediante el análisis de regresión lineal de la porción recta de la curva, se determinó la actividad enzimática pectolítica que viene representado por la respectiva pendiente, la ecuación representativa se muestra a continuación, las cuales expresan la variación del número de moles de grupos de aldehídos Vs. El tiempo en minutos por acción enzimática.

$$Y = 1.628 + 1.9536 X$$

$$r^2 = 0.96076$$

Utilizando la pendiente de la ecuación que viene hacer μmoles de grupos de aldehídos/ minutos ; se encuentra la actividad de la enzima y convirtiéndolo a enzima original se tiene 390.72 U/ml a pH 5.0 y 30°C

Anexo B-3: Resultados experimentales para la determinación de la actividad enzimática de la Pectinesterasa (PE).

TIEMPO (minutos)	NaOH (ml)
0.00	0.00
5.06	0.22
10.16	0.38
15.20	0.63
20.01	0.78
25.07	0.96
*30.04	1.14

Los datos experimentales del Anexo B-3 fueron sometidos a un análisis de regresión lineal, obteniéndose las ecuaciones que permitieron la representación gráfica de la figura 11, que se muestra a continuación y a partir de las cuales se calculó el gasto de NaOH a los 30 minutos; resultados que se muestran con el (*). El gasto determinado permitió calcular la actividad enzimática mediante el empleo de la fórmula que se indica en el método empleado.

Ecuación de la figura 11:

$$Y = \text{ml NaOH} \qquad X = \text{minutos}$$

$$Y = 0.01624 + 0.037865X$$

$$R^2 = 0.99872$$

Anexo B – 4: Resultados experimentales para la determinación de la actividad enzimática de la Pectinliasa (PL)

[E]: 0.125µg PL / ml		[E]: 0.016 µg PL/ml	
Tiempo minutos	Absorbancia 235 nm	Tiempo minutos	Absorbancia 235 nm
0.00	0.472	0.00	0.287
0.25	0.476	0.25	0.343
0.50	0.479	0.50	0.346
0.75	0.537	0.75	0.347
1.00	0.539	1.00	0.348
1.50	0.542	1.25	0.350
1.75	0.543	1.50	0.351
2.00	0.544	1.75	0.352
2.25	0.545	2.00	0.354
2.50	0.548	2.25	0.362
2.75	0.550	2.50	0.457
3.00	0.553	2.75	0.469
3.50*	0.555	3.00	0.470
4.00	0.677	3.50	0.472
5.00	0.688	4.00	0.476
6.00	0.694	5.00	0.478
7.00	0.701	6.00	0.483
8.00	0.703	7.00	0.492
9.00	0.810	8.00	0.555
10.00	0.819	9.00	0.578
		10.00	0.654
		11.00	0.661
		12.00	0.673
		13.00	0.682
		14.00	0.710
		15.00	0.790
		16.00	0.823

Los datos experimentales del Anexo B – 4 fueron sometidos a un análisis de regresión lineal, obteniéndose las ecuaciones que permiten representar la figura 10, y que se muestran a continuación ($C_1 = 0.125 \mu\text{g PL/ml}$ y $C_2 = 0.016 \mu\text{g PL/ml}$); a partir de las

cuales se obtiene el tiempo necesario para producir un incremento en la absorvancia de 0.03786/ minuto y 0.02954/ minuto.

Ecuaciones para la figura 10:

$$Y = 0.016235 + 0.03786X$$

$$r^2 = 0.9987$$

$$y = 0.3275 + 0.02954 X$$

$$r^2 = 0.98006$$

Anexo B – 5: Resultados experimentales para la determinación de la actividad enzimática de la Celulasa

[GLUCOSA] ml	ABSORBANCIA %
0.0	0.000
1.0	0.022
2.0	0.102
3.0	0.201
4.0	0.319
5.0	0.409
6.0	0.523
7.0	0.638
8.0	0.721
9.0	0.854
10.0	0.886
11.0	0.959
12.0	1.046

A partir de estos datos se tiene la ecuación para representar la figura 12, que se muestran a continuación:

$$Y = - 0.048549 + 0.09387 X$$

$$r^2 = 0.995408$$

Para determinar la actividad enzimática se basa en la cantidad estimada de enzima (concentración de enzima crítica = ml ml^{-1}) que libera 2.0 mg glucosa en la reacción [Enzima] 1/ dilución (volumen enzima diluyente/ volumen total de dilución)

ANEXO C

Anexo C – 1. Rendimiento de zumo (%) obtenidos con Poligalacturonasa después del prensado.

REP	0.01 ml [E]			0.03 ml [E]			0.05 ml [E]		
	30 min	60 min	90 min	30 min	60 min	90 min	30 min	60 min	90 min
R ₁	79.68	79.88	79.79	78.51	80.58	81.42	78.18	79.95	80.49
R ₂	79.48	79.38	79.96	77.46	79.60	80.21	78.38	79.77	79.80
Total	159.16	159.26	159.75	155.97	160.18	161.63	156.56	159.72	160.29
Prom	79.58	79.63	79.88	77.99	80.09	80.82	78.28	79.86	80.15

Anexo C – 2. Rendimiento de zumo (%) obtenidos con Biopectinasa LM después del prensado.

REP	0.01 ml [E]			0.03 ml [E]			0.05 ml [E]		
	30 min	60 min	90 min	30 min	60 min	90 min	30 min	60 min	90 min
R ₁	79.64	79.71	80.12	75.52	77.84	79.96	76.03	79.06	80.74
R ₂	79.83	80.03	79.98	76.64	75.32	77.60	77.30	79.42	80.69
Total	159.47	159.74	160.10	152.16	153.16	157.56	153.33	158.48	161.43
Prom	79.74	79.87	80.05	76.08	76.58	78.78	76.67	79.24	80.72

Anexo C – 3. Análisis de varianza de rendimiento de zumo (%) extraído por acción de Poligalacturonasa después del prensado

F. V.	G. L.	S. C.	C. M.	F. C.	Pr > F	Sig
Tratam.	9	14.1078	1.5675	11.38	0.0011	*
Bloque	1	1.095	1.095	7.95	0.225	N. S.
A [Enz]	2	0.232	0.116	0.84	0.4657	N. S.
B Tiempo	2	2.321	1.160	8.42	0.0107	*
A * B	4	10.460	2.615	18.98	0.0004	**
Error	8	1.1020	0.1378			
Total	17	15.2098				

$r^2 = 0.927547$

C.V. = 0.466356

Respuesta promedio = 79.5844

Anexo C – 4. Resultados de la prueba de tukey con un $\alpha = 0.05$ para evaluar el rendimiento de extracción de zumo, utilizando la enzima Poligalaturonasa

ORDEN	FACTORES					
	A [] Enzima			B Tiempo		
	a	x	Sig	b	x	Sig
1	a ₁	79.695	a	b ₃	80.037	a
2	a ₂	79.630	a	b ₁	79.558	ab
3	a ₃	79.428	a	b ₂	79.158	b

Anexo C – 5. Análisis de varianza de rendimiento de zumo (%) extraído por acción de Biopectinasa después del prensado

F. V.	G. L.	S. C.	C. M.	F. C.	Pr > F	Sig
Tratam.	9	48.3477	5.3719	5.84	0.0104	*
Bloque	1	0.182	0.182	0.20	0.6682	N.S.
A [Enz]	2	23.007	11.503	12.51	0.0034	**
B Tiempo	2	16.684	8.342	9.07	0.0088	**
A * B	4	8.475	2.119	2.30	0.1465	N.S
Error	8	7.357	0.9196			
Total	17	55.704				

$r^2 = 0.867933$ C.V. = 1.2195004 Respuesta promedio = 78.6350

Anexo C – 6. Resultados de la prueba de Tukey con un $\alpha = 0.05$ para evaluar el rendimiento de extracción de zumo, utilizando la enzima Biopéctinasa

ORDEN	FACTORES					
	A [] Enzima			B Tiempo		
	a	x	Sig	b	x	Sig
1	a ₁	79.885	a	b ₃	79.848	a
2	a ₃	78.873	a	b ₂	78.563	ab
3	a ₂	77.147	b	b ₁	77.493	b

ANEXO D

Anexo D - 1. Resultados de la variación de la viscosidad durante el tratamiento enzimático con poligalacturonasa

TIEMPO		LECTURA		50 °C	TIEMPO		6rpm	12rpm	30rpm
min							VISCOSIDAD (Centipoise (mPa*s))		
		6rpm	12rpm	30rpm	min	x 1000	x 1000	x 1000	
0	60	62	69	0	12	6.2	2.76		
10	42	49	58.5	10	8.4	4.9	2.34		
20	25	39	43	20	5	3.9	1.72		
30	24	29.5	32	30	4.8	2.95	1.28		

Anexo D - 2. Resultados de la variación de la viscosidad durante el tratamiento enzimático con Biopectinasa

TIEMPO		LECTURA		50 °C	TIEMPO		6rpm	12rpm	30rpm
min							VISCOSIDAD (Centipoise (mPa*s))		
		6rpm	12rpm	30rpm	min	x 1000	x 1000	x 1000	
0	61.5	63	73	0	12.3	6.3	2.92		
15	31.5	51.5	63.5	15	6.3	5.15	2.54		
30	29	38	60	30	5.8	3.8	2.4		
45	23	26	48	45	4.6	2.6	1.92		
60	19.5	22.5	35	60	3.9	2.25	1.4		

Anexo D - 3. Resultado para el diagrama reológico de la pulpa antes del tratamiento con poligalacturonasa

RPM	LECTURA	w rad/seg	M (Dinas .cm)	M (N-m)	Ln(M)	Ln(w)	TAO (Pa)	GAMMA (1/s)	Ln(TAO)	Ln(GAMMA)	TAO CORREG.
0.30	32.00	0.031416	215.584	2.15584E-05	-10.744745	-3.460437962	1.701837883	0.328196643	0.531708775	-1.114142328	1.630881998
0.60	34.00	0.062832	229.058	2.29058E-05	-10.6841204	-2.767290781	1.808202751	0.656393286	0.592333397	-0.420995148	1.862316656
1.50	40.00	0.15708	269.48	0.000026948	-10.5216015	-1.851000049	2.127297354	1.640983216	0.754852326	0.495295584	2.21941006
3.00	46.00	0.31416	309.902	3.09902E-05	-10.3818395	-1.157852869	2.446391957	3.281966432	0.894614268	1.188442765	2.534361362
6.00	60.00	0.62832	404.22	0.000040422	-10.1161364	-0.464705688	3.19094603	6.563932864	1.160317434	1.881589945	2.894006668
12.00	62.00	1.25664	417.694	4.17694E-05	-10.0833465	0.228441492	3.297310898	13.12786573	1.193107257	2.574737126	3.304688399
30.00	69.00	3.1416	464.853	4.64853E-05	-9.97637442	1.144732224	3.669587935	32.81966432	1.300079376	3.491027858	3.938352083
60.00	88.00	6.2832	592.856	5.92856E-05	-9.73314411	1.837879405	4.680054178	65.63932864	1.543309686	4.184175038	4.497234435

Anexo D - 4. Resultado para el diagrama reológico de la pulpa después del tratamiento con poligalacturonasa

RPM	LECTURA	w rad/seg	M (Dinas .cm)	M (N-m)	Ln(M)	Ln(w)	TAO (Pa)	GAMMA (1/s)	Ln(TAO)	Ln(GAMMA)	TAO CORREG.
0.3	14.0	0.031416	94.318	9.4318E-06	-11.5714236	-3.460437962	0.744554074	0.226586046	-0.294969798	-1.484630513	0.982779296
0.6	23.0	0.062832	154.951	1.54951E-05	-11.0749867	-2.767290781	1.223195978	0.453172091	0.201467088	-0.791483333	1.191053626
1.5	32.0	0.15708	215.584	2.15584E-05	-10.744745	-1.851000049	1.701837883	1.132930229	0.531708775	0.124807399	1.535605582
3.0	42.0	0.31416	282.954	2.82954E-05	-10.4728113	-1.157852869	2.233662221	2.265860457	0.80364249	0.81795458	1.861036963
6.0	48.0	0.62832	323.376	3.23376E-05	-10.3392799	-0.464705688	2.552756824	4.531720915	0.937173883	1.51110176	2.255435
12.0	58.0	1.25664	390.746	3.90746E-05	-10.1500379	0.228441492	3.084581163	9.063441829	1.126415882	2.204248941	2.733415372
30.0	61.0	3.1416	410.957	4.10957E-05	-10.0996071	1.144732224	3.244128464	22.65860457	1.176846736	3.120539673	3.524146865
60.0	66.0	6.2832	444.642	4.44642E-05	-10.0208262	1.837879405	3.510040634	45.31720915	1.255627614	3.813686853	4.270997484

Anexo D - 5. Resultado para el diagrama reológico de la pulpa antes del tratamiento con biopectinasa

RPM	LECTURA	w rad/seg	M (Dinas .cm)	M (N-m)	M Ln(M)	M Ln(w)	TAO (Pa)	GAMMA (1/s)	Ln(TAO)	Ln(GAMMA)	TAO CORREG.
0.3	34.0	0.031416	229.058	2.29058E-05	-10.6841204	-3.460437962	1.808202751	0.37417818	0.592333397	-0.983023177	1.883550209
0.6	42.0	0.062832	282.954	2.82954E-05	-10.4728113	-2.767290781	2.233662221	0.74835636	0.80364249	-0.289875997	2.116051135
1.5	46.0	0.15708	309.902	3.09902E-05	-10.3818395	-1.851000049	2.446391957	1.870890901	0.894614268	0.626414735	2.468017556
3.0	52.0	0.31416	350.324	3.50324E-05	-10.2592372	-1.157852869	2.76548656	3.741781802	1.01721659	1.319561916	2.772663731
6.0	61.5	0.62832	414.3255	4.14326E-05	-10.0914438	-0.464705688	3.270719681	7.483563603	1.185010047	2.012709096	3.114914701
12.0	63.0	1.25664	424.431	4.24431E-05	-10.0673462	0.228441492	3.350493332	14.96712721	1.209107598	2.705856277	3.49941231
30.0	73.0	3.1416	491.801	4.91801E-05	-9.92002149	1.144732224	3.88231767	37.41781802	1.356432313	3.622147009	4.081475571
60.0	90.0	6.2832	606.33	0.000060633	-9.71067126	1.837879405	4.786419046	74.83563603	1.565782542	4.315294189	4.58528314

Anexo D - 6. Resultado para el diagrama reológico de la pulpa después del tratamiento con biopectinasa

RPM	LECTURA	W rad/seg	M (Dinas .cm)	M (N-m)	M Ln(M)	M Ln(w)	Tao (Pa)	GAMMA (1/s)	Ln(TAO)	Ln(GAMMA)	TAO CORREG.
0.3	25.0	0.031416	168.425	1.68425E-05	-10.9916051	-3.460437962	1.329560846	0.359101971	0.284848697	-1.024148889	1.536193223
0.6	33.0	0.062832	222.321	2.22321E-05	-10.7139734	-2.767290781	1.755020317	0.718203942	0.562480433	-0.331001709	1.734270202
1.5	42.0	0.15708	282.954	2.82954E-05	-10.4728113	-1.851000049	2.233662221	1.795509855	0.80364249	0.585289023	2.035841333
3.0	46.5	0.31416	313.2705	3.13271E-05	-10.3710286	-1.157852869	2.472983174	3.591019709	0.905425184	1.278436204	2.298343013
6.0	50.0	0.62832	336.85	0.000033685	-10.2984579	-0.464705688	2.659121692	7.182039418	0.977995877	1.971583384	2.594691697
12.0	59.0	1.25664	397.483	3.97483E-05	-10.1329435	0.228441492	3.137763597	14.36407884	1.143510316	2.664730565	2.929251624
30.0	63.0	3.1416	424.431	4.24431E-05	-10.0673462	1.144732224	3.350493332	35.91019709	1.209107598	3.581021297	3.438617308
60.0	66.0	6.2832	444.642	4.44642E-05	-10.0208262	1.837879405	3.510040634	71.82039418	1.255627614	4.274168477	3.881993126

ANEXO E

Anexo E-1. Costo de producción

(Costo por caja de 24 botellas de 300ml)

RUBROS	UM	CANT	P. UNIT	PARCIAL	TOTAL
MATERIALES DIRECTOS			S/.	S/.	S/.
Membrillo	Kg	10.0000	0.5000	5.000000	5.1715
Sorbato de potasio	Kg	0.0160	0.0040	0.000064	
Enzima	Ml	0.0800	2.1429	0.171429	
MANO DE OBRA DIRECTA					0.4640
Salario por caja			0.4000	0.4000	
Leyes sociales	16%		0.0640	0.0640	
GASTOS DE FABRICACION (Materiales indirectos, Mano de obra indirecta, y Otros gastos de fabricación)	12%				0.6206
GASTOS DE DISTRIBUCION (Gastos de Administración, Gastos de ventas, y Gastos financieros)	20%				1.0343
				TOTAL	7.2904

Anexo E-2. Precio de venta sugerido

RUBROS	MU	CAJA	BOTELLA
Costo unitario total		S/.	S/.
		7.29	0.30
Margen de utilidad mayorista	30%	2.19	0.09
PRECIO DE VENTA BODEGAS		9.48	0.39
Margen de utilidad minorista	30%	2.84	0.12
PRECIO VENTA AL PUBLICO		12.32	0.51