

“Extracción y Estudio Comparativo de las Enzimas Proteolíticas del Fruto Toronche (Carica-Stipulata) y de la Papaya (Carica-Papaya) y su Aplicación en la Industria Alimenticia”

E. Aguirre, P. Castillo
Facultad de Ingeniería Mecánica y Ciencias de la Producción
Escuela Superior Politécnica del Litoral
Campus Gustavo Galindo, Km 30.5 vía Perimetral, Apartado: 09-01-5863, Guayaquil, Ecuador.
eaguirre@espol.edu.ec, pcastillo@espol.edu.ec

Resumen

En el presente trabajo se realizó la extracción y el estudio comparativo de las Enzimas Proteolíticas del fruto toronche y de la papaya y su aplicación en la industria alimenticia. El látex fue extraído mediante incisiones verticales en la fruta verde del toronche como de la papaya, las cuales fueron sometidas al proceso de extracción del látex y al proceso de secado del látex mediante el método de secado con estufa, al igual que se realizaron experimentaciones para determinar la actividad enzimática de la enzima papaína presente en el látex de ambos frutos mediante el método de coagulación de leche (Balls and Hoover) y el método de determinación de proteínas en leche. Por otro lado se realizó la aplicación de la enzima papaína en la industria cervecera demostrando que por cada 11 gr de enzima papaína obtenida del fruto toronche se obtiene la turbidez necesaria para un hectolitro de cerveza comercial.

Palabras claves: extracción, secado, actividad enzimática, toronche.

Abstract

Work performed for this research was to extract and to study Toronche's and Papaya's Proteolytic Enzymes and their application in the nutritional food industry. The latex was extracted by means of vertical incisions in the green fruit of the toronche as the papaya, which were submitted to the process of extraction of the latex and to the process of dried of the latex by means of the method of dried by stove, as experimentations were realized to determine the enzymatical activity of the present enzima papaína in the latex of both fruits by means of the method of coagulation of milk (Balls and Hoover) and the method of determination of proteins in milk. On the other hand, the papain enzyme was applied in the brewing industry. Demonstrating that to obtain the necessary turbidity for one hectoliter commercial beer you need 11g of Toronche's papain enzyme.

Keywords: extract, dry, enzymatic activity, toronche.

1. Introducción

La industrialización de frutas en nuestro país está limitada hacia la exportación de jugos, concentrados, conservas y mermeladas, sin considerar otros principios activos que contienen las frutas como subproductos, sean estos proteicos o enzimáticos los cuales pueden ser usados como colorantes, clarificantes, saborizantes y coadyuvantes de ciertas reacciones químicas en la elaboración de otros productos. El toronche es una fruta poco conocida en nuestro país con excelentes características nutricionales, esta fruta se la puede encontrar en distintas regiones del país como son El Oro, Loja y

Azuay, con mayores producciones del fruto en la provincia de Loja, la comuna Cochechorral cuenta con una plantación aproximadamente 1700 hectáreas[6], con el objetivo de mejorar el fruto e incentivar a la industrialización en otras provincias, esta comuna se encuentra desarrollando productos a base del fruto toronche como son mermeladas, aguas aromáticas, jugos y toronches en almíbar, estos productos se comercializan en la provincia de Loja, también es importante destacar que el fruto toronche al pertenecer a la familia de las caricáceas contiene en su composición papaína que es una enzima proteolítica utilizada en la industria cervecera y en la industria cárnica.

En el continente Americano los países de Estados Unidos, México y Chile son los mayores productores de la enzima papaína extraída del fruto papaya. Es por eso que el objetivo principal de esta tesis es determinar la existencia de la papaína en el toronche (*Carica-Stipulata*) y compararla con la papaína extraída de la papaya (*Carica-Papaya*) estableciendo una comparación entre las dos enzimas, el grado de efectividad y el costo en su extracción, de ser efectivo y rentable esto evitará la importación de materia prima de mayor costo, de esta forma se brindará una nueva alternativa de la obtención de la enzima papaína del fruto toronche en nuestro país.

2. Materiales y Métodos

2.1. Materia Prima.

El toronche es una fruta tradicional de la provincia de Loja con las siguientes características en su producción y cultivo. Las plantas crecen hasta una altura de 10m aproximadamente, propagadas por semillas o por estacas; típico estípulas que se convierten en espinas después de la caída de las hojas, hojas lobuladas, flores blancas variable, de color amarillo a rojizo, plantas dioicas, frutas variable 10-lobulado, de color verde amarillento a naranja en la madurez. En comparación con el común de las papayas, los frutos son muy pequeños llegan a medir 6-15cm los grandes y 3-8 cm los pequeños; un peso de 40-150g, (Ver Figura 1.1.), muchas semillas; pulpa de color amarillo crema y posee un fuerte y agradable aroma.

Su composición nutritiva incluye proteínas, carbohidratos, vitaminas, calcio, potasio y fósforo considerándose una fruta con altas propiedades nutritivas, al igual que en su composición los frutos inmaduros tienen tal vez el más alto contenido de una enzima proteolítica conocida como enzima papaína muy utilizada actualmente en diferentes industrias a nivel mundial [3].



Figura 1.1. Fruto Toronche

Entre los componentes enzimáticos que posee el toronche (*Carica-Stipulata*) están las enzimas proteolíticas como la papaína, que tiene la capacidad

de digerir las proteínas de los alimentos ver figura 1.2., que se obtiene a partir del látex de la fruta verde de la papaya (*Carica-Papaya*) antes que comience su maduración [5].

La papaína, se caracteriza por ser un polvo amorfo, granuloso de color blanco, grisáceo o parduzco; ligeramente higroscópico e insoluble en agua y en la mayoría de solventes orgánicos. Es soluble en alcohol etílico y metílico.

La papaína bruta, contiene un poco de agua, glúcidos, ácidos orgánicos y una mezcla de enzimas, donde destacan las denominadas proteasas que actúan rompiendo los enlaces peptídicos en cualquier lugar de la cadena peptídica en la que se hallen situados (endopeptidasas). También contiene pequeñas cantidades de otras enzimas: papaína peptidasa A, lipasa y lisozima (enzima que rompe las paredes de las células bacterianas) [2].



Figura 1.2. Estructura de la Enzima Papaína.

2.2. Métodos Experimentales

2.2.1. Extracción del Látex de la fruta [1]

- Limpiar y desinfectar el área de trabajo y los utensilios a utilizar para el proceso de extracción del látex.
- Colocarse guantes plásticos desechables para evitar alguna irritación en la piel.
- Para la extracción del látex de papayas y de toronches se seleccionan frutos verdes y completamente desarrollados.
- Lavar las frutas de toronches y papayas que van a ser utilizadas para el proceso, secarlas bien con papel toalla para evitar contaminaciones.
- Pesar las frutas de toronches y papayas, para determinar el rendimiento del látex extraído una vez procesado.
- El fruto puede recibir varias incisiones repetidamente a intervalos de tres a cinco días, hasta que la aparición del látex comience a disminuir.
- Todas las incisiones deben ser hechas verticalmente y no más de 4 sangrías deben hacerse a un fruto al mismo tiempo, de 1 a 2 mm de espesor cada incisión.

- Se colocan recipientes bajo las frutas para la recepción del látex y su concentración. Estos pueden ser de diferentes materiales o formas.



Figura 2.2. Extracción del Látex del Toronche

2.2.2. Procesamiento del látex.

El látex debe ser procesado inmediatamente después de ser extraído del fruto, ya que el objetivo principal es preservar la actividad proteolítica de la enzima.

Para la operación de secado debe transcurrir el menor tiempo posible después de la recolección, a fin de que la actividad del látex no disminuya. El secado se puede hacer de diferentes formas: a pleno sol, utilizando una estufa, un secador de cabina con bandejas, o cualquier otro tipo de horno o fuente de calor.

A continuación detallare cada uno de los pasos a seguir en el procesamiento del látex con el secado con estufa. [9].

- Prender la estufa a una temperatura de 50 °C.
- Pesar la caja petri.
- Una vez el látex extraído en una caja petri, colocarlo en la estufa por aproximadamente 3 a 4 horas dependiendo de la cantidad de látex.
- Chequear cada determinado tiempo el látex dentro de la estufa.
- En el momento en el que el látex no se pegue y este en forma granulada, esto quiere decir que el proceso de secado ha finalizado.
- Pesar la caja petri con el látex ya seco.
- Colocar el polvo en un mortero y molerlo, hasta que los gránulos de látex seco se pulvericen.
- Colocar el polvo en un recipiente de vidrio oscuro bien sellado.
- Colocar el recipiente en la refrigeradora, para un mejor mantenimiento de la enzima.

2.2.3. Determinación de Actividad Enzimática.

Para la determinación de la actividad enzimática, se detallaran a continuación los dos métodos, utilizados para comprobar la existencia de la enzima papaína y su efectividad.

1. Método de coagulación de leche (Balls and Hoover).

Hay diferentes métodos de comprobación de actividad de una enzima. Este método confía en la capacidad de la papaína en coagular la leche, los análisis se realizaran en 10 mililitros de leche deshidratada, a diferentes concentraciones de papaína (0.0025, 0.005, 0.01 y 0.02) gramos por mililitro de ácido acético, una vez preparada la solución de papaína con ácido agregar a la leche (0.5, 1, 2, 4, 6 y 7) mililitros respectivamente [8].

Esterilizar los instrumentos que se van a utilizar en el autoclave por 45 minutos, y luego colocarlos en la estufa a 120°C por 30 minutos para eliminar residuos de agua. Se deja enfriar a temperatura ambiente (28 ± 2 °C).

- Pesar 7.75 gramos de leche en polvo.
- Colocar 54 mililitros de agua en un vaso de precipitación.
- Diluir la leche en el agua y calentarla a 30°C en un baño de agua y mantener esta temperatura, en una cocineta eléctrica.
- Pesar las diferentes cantidades del polvo de látex seco (0.0025, 0.005, 0.01 y 0.02) gramos por mililitros de ácido acético.
- A una cantidad determinada de leche (10 mililitros), agregar las cantidades de la solución de látex seco diluido en ácido acético (0.5, 1, 2, 4, 6 y 7) mililitros.
- Mezclar el contenido a fondo y controlar el tiempo que demora para detectar la coagulación de la leche (formación de coágulos).
- El tiempo tomado para alcanzar esta etapa, de cuando el polvo de látex seco diluido en el ácido fue agregado a la leche, se registra para cada uno de los experimentos.
- Las diversas cantidades de muestra del polvo de látex seco usado deben dar una gama de los tiempos de coagulación entre 20 y 150 segundos para los resultados óptimos.

2. Método de determinación de proteínas en Leche.

Este método se basa en la descomposición de los compuestos de nitrógeno orgánico por ebullición con ácido sulfúrico. El hidrógeno y el carbón de la materia orgánica se oxidan para formar agua y dióxido de carbono. El ácido sulfúrico se transforma en sulfato, el cual reduce el material nitrogenado a sulfato de amonio.

El amonio se libera después de la adición de hidróxido de sodio y se destila recibiendo en una solución de ácido sulfúrico 0.1N. Se titula el nitrógeno amoniacal con una solución valorada de hidróxido de sodio 0.1N. En este método se usa el sulfato de cobre como catalizador y el sulfato de sodio para aumentar la temperatura de la mezcla y acelerar la digestión.

Este método consta de tres etapas, la primera etapa preparación de la muestra, segunda etapa

procedimiento para la digestión y por último la tercera etapa el procedimiento para la destilación [10].

Primera etapa.

- Agregar al tubo de digestión 15 g de sulfato de sodio y 0,5 g de sulfato de cobre pentahidratado.
- Calentar la leche a $38^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
- Mezclar la muestra para homogenizar.
- Pesar $5\text{ml} \pm 0,1\text{ml}$ de la muestra caliente e inmediatamente colocarla en el tubo de digestión.
- Adicionar 25ml de ácido sulfúrico.

Segunda etapa.

- Al inicio se fija una temperatura baja en el equipo de digestión (180 a 230°C) para evitar la formación de espuma.
- Se colocan los tubos, con el extractor conectado en el equipo de digestión. El vacío debe ser suficientemente bueno para eliminar los vapores.
- Digerir por 30 minutos o hasta que se formen vapores blancos.
- Incrementar la temperatura de 410 a 430°C y digerir hasta que se aclare la solución. Podría ser necesario incrementar la temperatura en forma gradual, cada 20 minutos, para el control de la espuma.
- Evitar que la espuma dentro del tubo alcance el extractor o llegue a una distancia de 4-5cm del borde superior del tubo.
- Después de que la solución se acabe (cambie de color azul claro a verde), continúe en la ebullición cuanto menos por una hora.
- El tiempo aproximado de digestión es de 1,75 a 2,5 horas. Al término de la digestión, la solución debe ser clara y libre de material sin digerir.
- Enfriar la solución a temperatura ambiente (aproximadamente por 25 minutos).
- La solución digerida debe ser líquida con pequeños cristales en el fondo del tubo (la cristalización excesiva indica poco ácido sulfúrico residual al fin de la digestión y podría generar bajos resultados. Para reducir las pérdidas de ácido durante la digestión, reducir la tasa de extracción de vapores).
- Después de enfriar la solución a temperatura ambiente, adicionar 200ml de agua (el blanco puede requerir 150ml) a cada tubo, tape para mezclar y deje enfriar a temperatura ambiente.
- Cuando se adiciona agua a temperatura ambiente se pueden formar algunos cristales, para después integrarse nuevamente a la solución; esto es normal.
- Los tubos se pueden tapar para llevar a cabo la destilación posteriormente.

Tercera etapa.

- Coloque la solución de hidróxido de sodio al 45% en el depósito de álcali de la unidad de destilación.

- Ajuste el volumen de dosificación a 70ml de hidróxido de sodio.
- Coloque el tubo de digestión que contiene la solución en la unidad de destilación.
- Coloque un matraz Erlenmeyer de 500ml con 50ml de la solución de ácido sulfúrico 0.1N con indicador (rojo de metilo) sobre la plataforma de recepción, asegurándose que el tubo del condensador se encuentre dentro de la solución de ácido sulfúrico.
- Destilar hasta obtener un volumen de 150ml.
- Retirar el matraz de recepción.
- Titular el destilado con hidróxido de sodio 0.1N utilizando el indicador de Wesslob o el potenciómetro.
- Registrar el volumen utilizado de hidróxido de sodio con una exactitud de 0,05ml.

Fórmulas para determinar % de Proteínas en leche.

$$\% \text{ N} = \frac{V \cdot N \cdot 0.014 \cdot 100}{100} \quad \text{Ec. 1}$$

$$\% \text{ de Proteína Caseína} = \% \text{ N} \times 6.38 \text{ (factor)} \quad \text{Ec.2}$$

3. Resultados.

3.1. Características de la materia Prima.

Las características físico-químicas del toronche fueron Sólidos Solubles ($^{\circ}\text{Brix}$) ± 8.94 , $\text{pH} \pm 4.04$ y las especificaciones organolépticas fueron color verde y aroma aromático.

Las características físico-químicas de la papaya fueron Sólidos Solubles ($^{\circ}\text{Brix}$) ± 8.75 , $\text{pH} \pm 4.75$ y las especificaciones organolépticas fueron color verde y aroma característico de la fruta.

3.2. Extracción de Papaina.

En el proceso de extracción de la enzima del fruto toronche se obtuvo un polvo blanco - cremoso que se presenta en el siguiente tabla.

Cantidad de Toronche	Peso (lb)	Gr de látex seco	Tiempo de secado	Humedad %
5	1	0.9825	3 h	4
7	1.69	1.5492	3.10 h	4.2

Al igual que el toronche, en el proceso de extracción del látex de la papaya se obtuvo la siguiente tabla.

Cantidad de Papaya	Peso (lb)	Gr de látex seco	Tiempo de secado	Humedad %
2	11.25	2.9852	3.45 h	4.3
2	11.44	3.0015	3.55 h	4.5

3.3. Análisis de Actividad Enzimática de la papaína del Toronche y la Papaya.

En los análisis de actividad enzimática con el método de coagulación de leche (Balls and Hoover), se obtuvo una gama de tiempos de coagulación a las diferentes concentraciones de enzima papaína adicionada a la leche, observando que a medida que aumenta la concentración de papaína diluida en ácido y agregada en la leche el tiempo de coagulación de la leche disminuye en todos los análisis realizados.

Para demostrar que la papaína de ambos frutos es activa, se procedió hacer un análisis de determinación de proteínas en leche, con el método de Kjeldahl.

Los datos obtenidos en estas pruebas en el laboratorio para la leche, al igual que las pruebas por triplicado del suero proveniente del ácido más cada una de las papaínas se encuentra en las siguientes tablas.

Porcentaje de Proteína Caseína sin Enzima

Leche	3.789%
Suero (leche + ácido acético)	1.9304%

Porcentaje de Proteína Caseína en Suero

Suero (leche + solución de ácido acético con papaína Papaya)			Promedio
0.718%	0.578 %	0.5988%	0.6316%
Suero (leche + solución de ácido acético con papaína Toronche)			
0.6869%	0.641%	0.753%	0.6937%

En la tabla de porcentaje de proteína caseína sin enzima, se puede observar que el % de caseína en la leche es de 3.789%, mientras que al adicionar ácido acético a la leche el % de caseína en el suero es de 1.9304% es decir que la proteína ha disminuido, en comparación con la tabla de porcentaje de proteína caseína en suero, se puede observar que en el análisis por triplicado en el suero producto de la adición de la solución de ácido mas papaína a la leche ha disminuido en ambos casos sea papaína de toronche o papaína de papaya. La enzima no ha reaccionado por completo con la proteína, debido a que la papaína no ha pasado por un proceso de purificación.

4. Aplicación de Papaína en la Industria Cervecera.

4.1. Diagrama del proceso de la cerveza [4].

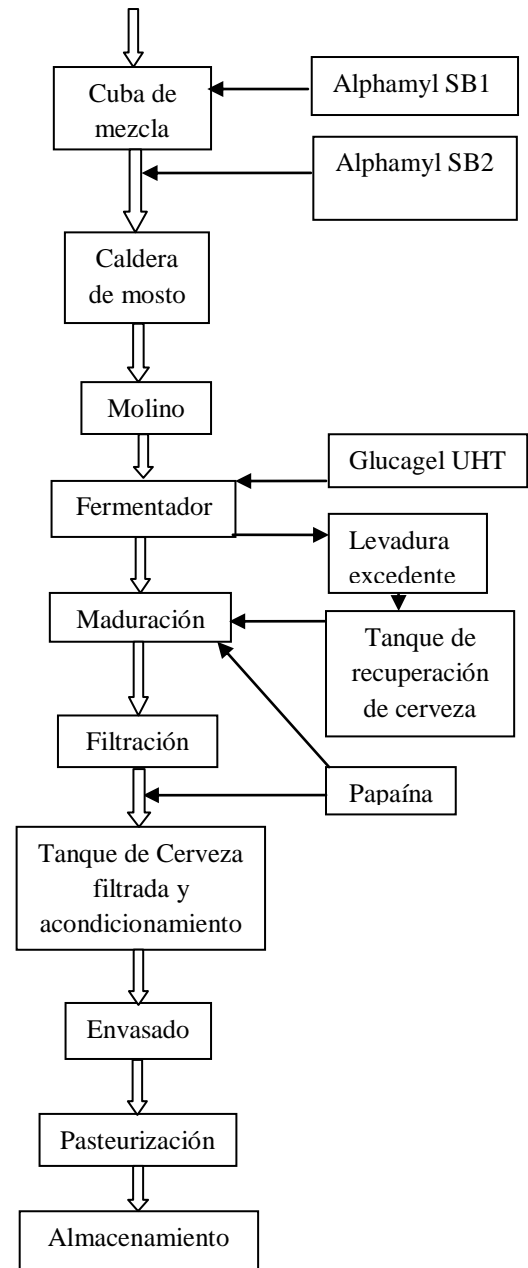
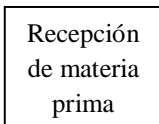


Figura 4.1. Descripción de Elaboración de Cerveza.

4.2. Aplicaciones de la enzima papaína en la clarificación de bebidas.

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

la mejor calidad para la acción exclusiva de clarificación y estabilización.

La enzima papaína se puede utilizar durante la fase de maduración de la cerveza o bien en la cerveza filtrada. Las dosis de utilización se ubican en rangos variables entre 0,5 y 1 g/hL en la fase de maduración y entre 1 y 1,5 g/hL en la cerveza filtrada. Las concentraciones del tratamiento establecidas por los técnicos son en función de la situación del volumen a gestionar, de las condiciones de turbidez [7].

4.3. Resultados.

Las pruebas con diferentes cantidades de papaína demuestran que se obtiene una turbidez de 0.69 EBC con 11 gramos de papaína toronche por hectolitro de cerveza y una turbidez EBC de 0.64 cuando se agregan 10 gramos por hectolitro de cerveza con papaína papaya.

La enzima papaína extraída del toronche y la papaya no se encuentran 100% pura debido a que no fueron sometida a un proceso de purificación en ninguno de los casos, es por esta razón que los gramos necesarios para el uso en el proceso de elaboración de cerveza son muy altos a diferencia de la enzima papaína utilizada en la clarificación de cerveza en otros países que es de 1-1.5 gr/hl, pero con esas cantidades se llegó a obtener la cantidad de turbidez que como requisito puede tener una cerveza comercial.

5. Conclusiones

Este estudio ha demostrado que la fruta toronche además de poseer excelentes características nutricionales, también se encuentra la enzima papaína como una nueva fuente de obtención de la misma en nuestro país, para ser utilizada en la industria alimenticia.

La papaína extraída del toronche al comparar su actividad con la papaína de la papaya en los distintos análisis realizados a estas enzimas, se llega a la conclusión que las enzimas tienen similares características en la actividad enzimática con una diferencia mínima en los tiempos de coagulación en la leche, al igual que los análisis con el método de Kjeldahl en los resultados del porcentaje de caseína en el suero al comparar las dos enzimas papaínas nos damos cuenta que la diferencia tampoco es significativa.

En el proceso de elaboración de cerveza es necesario adicionar distintas sustancias a lo largo su elaboración, es por eso que con los estudios realizados se demuestra que es necesario agregar 11 gramos de enzima papaína de toronche en la etapa de filtración por cada hectolitro de cerveza procesada y así obtener una cerveza con excelentes características en su apariencia, ya que la enzima papaína agregada evita la turbidez en la cerveza y le brinda un color

agradable a la vista del público consumidor de la misma.

6. Bibliografía

- [1] Barahona, Proyecto de Producción de fruta y látex de papaya, Honduras, 1983.
- [2] Chávez, Enzimología, Editorial Goudelias, 1998.
- [3] Cueva Cabrera O. y Van Den Eynden V., Plantas silvestres comestibles del Sur del Ecuador, Ediciones Abya-Yala, Quito, Ecuador. 1999, Pág. 26.
- [4] J.S. Hough, Biotecnología de la cerveza y de la malta, Editorial Acribia, 1990.
- [5] Lassoudiere A, La papaína (producción, propiedades y utilización), Frutas, Vol. # 21, 1969, Pág. 11 – 12.
- [6] Probona, Manejo y Aprovechamiento del Toronche, Loja – Ecuador, 2005.
- [7] Biotecnología Alimentaria
www.books.google.com.ec/books?isbn=9681845226...
- [8] Comparación de distintos Métodos para medir la Actividad Enzimática
www.unne.edu.ar/Web/cyt/cyt/2000/8_exactas//e_021.pdf
- [9] Información Tecnológica – Métodos de Secado
www.books.google.com.ec/books?id=vnUZE-9tdbEC
- [10] Norma Oficial Mexicana Nom -155-scfi-2003, Determinación de Proteínas en leche
<http://148.206.53.231/bcdrom/GAM06/GAMV15/.../NOM-820.PDF>

