

20
29.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ESTABLECER LAS CONDICIONES OPTIMAS DE EXTRACCION DE BETALAINAS PROVENIENTES DEL BETABEL (*Beta - vulgaris*) A TRAVES DE UN SISTEMA ENZIMATICO.

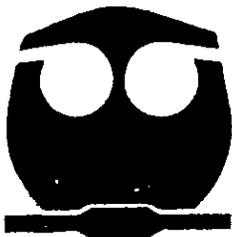
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO DE ALIMENTOS

P R E S E N T A :

ABEL GERARDO JIMENEZ ESPINOSA



MEXICO, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

1998

268577

TESIS CON
FALTA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado Asignado:

Presidente Prof. Hermilo Leal Lara.
Vocal Prof. Marcos Francisco Baéz Fernández.
Secretario Prof. Hugo Ruben Carreño Ortiz.
1er. Suplente Prof. Rodolfo Cuervo Coss.
2do. Suplente Prof. Ismael Bustos Jaimes.

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 4-A. Departamento de Alimentos y Biotecnología.

Facultad de Química

Universidad Nacional Autónoma de México.

• **Asesor del tema:** M.C. Marcos Francisco Báez Fernández.



Sustentante: Abel Gerardo Jiménez Espinosa.



DEDICATORIAS.

A mi Familia:

Abel y Matilde, Gaby y Adriana.

Por estar aquí conmigo, pero sobre todo por su enorme confianza en mí.

AGRADECIMIENTOS.

- **A quienes puedo llamar como mis amigos, por dejarme compartir su amistad.**

- **Al M.C. Marcos F. Báez F. por la oportunidad brindada.**

- **A Gabriela Inzunza que al proporcionar las enzimas necesarias, provocó que un proyecto se convirtiera en este trabajo.**

- **A todos aquellos que con su vida y ejemplo permiten que en las noches de eterna oscuridad pueda aun, vislumbrarse la esperanza.**

- **A la Facultad de Química por la formación académica.**

- **A la UNAM por existir.**

GRACIAS.

**“Es con esta convicción, la que nos permitirá
arrancar de este océano de desesperación,
una gota de esperanza”**

Martin Luther King.

**“...todo se hace en silencio,
como la luz dentro del ojo...”**

Jaime Sabines.

ÍNDICE

Capítulo	página.
1. Introducción.	1
2. Justificación del Trabajo.	11
3. Objetivos.	13
4. Material y Métodos.	14
4.1 Diseño Experimental.	14
4.2 Métodos de análisis.	18
5. Resultados y Discusión.	24
6. Conclusiones.	56
7. Anexo.	57
8. Bibliografía.	59

**"... I have spoke with the
tongue of angels..."**

Bono.

INTRODUCCIÓN.

1.-INTRODUCCIÓN

1.1 EL COLOR.

El color representa una parte esencial en el desarrollo del hombre, en sus diversas manifestaciones sociales, culturales y ambientales. El color se basa en una serie de procesos físicos, químicos, fisiológicos y psicológicos (20). Las sensaciones que percibe el hombre cuando observa un objeto en particular las asocia con las cosas que lo rodean, esto es especialmente evidente en el área alimentaria, donde la relación entre el color y el sabor son muy importantes para que el consumidor adquiera un producto, ya que de lo contrario, no se aceptaría; Es por eso que actualmente se busca siempre en los alimentos una apariencia natural (20).

El color de los alimentos no solo envía un mensaje al consumidor sino que proporciona claves acerca de las condiciones físicas en las que se encuentra el alimento. Un color inadecuado en un alimento crea una barrera que la mayoría de los consumidores no puede superar, inclusive muchos se negarían a probar el alimento a causa del color inadecuado (25). Los tecnólogos en alimentos tienen un interés particular en el color de los alimentos por ciertas razones particulares, una de ellas es mantener la uniformidad del color en el alimento elaborado, otra de las razones es evitar un cambio en la coloración del alimento debido a reacciones químicas que ocurren durante su elaboración o su almacenamiento.

Optimizar el color y la apariencia del alimento en relación con la preferencia del consumidor, y mantener uniforme el color de acuerdo con las expectativas que el consumidor tenga de ese producto, son dos parámetros muy importantes para las industrias alimentarias (25). En el área de los alimentos la aplicabilidad de los colorantes es evidente y se usan como aditivos, pues no son los constituyentes esenciales (14). Según la Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos, un aditivo colorante es cualquiera materia, tinte, pigmento u otra sustancia producida por un proceso de síntesis o por otra estrategia, extraído o aislado, o derivado de otra manera, con o sin cambio de identidad intermedia o final, de un animal, un mineral, o de otra fuente y que al añadirlo o al aplicarlo a un alimento, droga, o cosmético, o al cuerpo humano, es capaz de impartir color por si mismo o mediante una reacción con otra sustancia (9).

La mayoría de los colorantes pueden ser divididos en tres categorías:

1. Colorantes de origen orgánico provenientes de plantas o animales, inclusive extractos naturales y los llamados colorantes sintéticos idénticos al natural (compuestos que se obtienen por vía sintética pero que dan como producto uno que es exactamente igual al colorante de origen natural).
2. Colorantes de origen inorgánico, que son tomados de la naturaleza o reproducidos en forma sintética.
3. Colorantes artificiales, compuestos de origen sintético que no están presentes en forma natural en los alimentos a los cuales son adicionados.

Por otro lado, existen otros compuestos que imparten color que son de origen natural y que debido a sus características físicas y químicas pueden ser incluidos en los grupos anteriores; ejemplos de estos los son:

Los carotenos, las clorofilas, los flavonoides, las betalainas, las antocianinas y los pigmentos inorgánicos (2).

Por último, se encuentra un grupo muy heterogéneo de compuestos que imparte color y que son formados intencional o no intencionalmente en el alimento durante su procesamiento. En este grupo se encuentran las melaninas y las melanoidinas.

Conviene señalar que los colorantes, de acuerdo con los niveles que se usan en los alimentos, no tienen ninguna incidencia en el sabor o en las propiedades de los productos donde se aplican, además de no ser tóxicos ni tener consecuencias secundarias en el organismo (25). Los colores naturales, han sido utilizados como aditivos colorantes sin problema alguno en la industria alimentaria. Desafortunadamente, muchos de estos colorantes se degradan fácilmente, razón por la cual se usan los colorantes sintéticos. Sin embargo desde hace algunos años se ha demostrado que no todos los colorantes sintéticos son inofensivos para los seres humanos y continuamente se eliminan algunos colorantes sintéticos de las listas permitidas (11).

Algunas de las características deseables para un colorante que será aplicado a los alimentos se enlistan a continuación:

- a) Deberá tener una amplia aplicabilidad, por lo que deberá ser soluble y/o dispersable para que pueda ser incorporado al alimento.
- b) De preferencia no deberá proporcionar ni sabor ni olor al alimento.
- c) Dentro del alimento, deberá ser estable a diversos factores como son: luz, pH, temperatura y ser estable durante la vida de anaquel que tenga el producto.
- d) Deberá ser susceptible de ser cuantificado dentro y fuera del alimento por medio de técnicas analíticas.
- e) Ser un aditivo aprobado por las reglamentaciones internas del país y preferentemente cumplir con las reglamentaciones mundiales.

Los grupos de pigmentos naturales que pueden ser aplicados a alimentos y con interés comercial son:

-Clorofila

-Cúrcuma

-Hemoglobina.

-Carotenos

-Rojo cochinilla

-Antocianinas

-Paprica

-Betalainas

-Bixina y Norbixina

Se ha estimado que como fuente natural se produce anualmente 100 millones de toneladas de carotenos. Por otro lado, la producción anual de los pigmentos naturales enlistados, no se ha estimado con precisión sin embargo son considerados de gran importancia para la industria de los alimentos (11).

1.2 POR QUÉ USAR COLORANTES NATURALES ?

Actualmente los consumidores se están convirtiendo en personas que se preocupan más por lo que comen que en épocas anteriores; se está desarrollando un interés especial en saber que clase de alimento consumen y que tipos de aditivos están presentes en los alimentos. Sin entender del todo las necesidades fisiológicas del cuerpo humano, ni como metaboliza éste ciertos productos químicos, los consumidores muestran un recelo a todo aquello que no les es familiar y que esta contenido en los productos que consumen y dentro de los cuales se pueden señalar a los antioxidantes, conservadores y los colorantes. En busca de una solución a sus dudas, los consumidores rápidamente adoptan el concepto de que si el aditivo es de origen natural, entonces será seguro e inofensivo para su salud (2). Como consecuencia de esto, se establece la necesidad para las industrias alimentarias, de elaborar colorantes seguros, para satisfacer las necesidades de los consumidores.

Por otro lado, el mercado potencial de los colorantes naturales tiene un amplio futuro y las ganancias económicas tienen iguales expectativas (2). Actualmente hay una preferencia casi mundial por los colorantes naturales. Por ejemplo, las listas de colorantes permitidos en Suiza, distinguen a los colorantes presentes en los alimentos como aquellos que están presentes en forma natural y los colorantes que no están presentes en forma natural en un determinado alimento (2). En Suecia, el uso de colorantes artificiales está restringido a un pequeño número de productos, y un ejemplo más radical lo representa Noruega, en donde los colorantes artificiales no se utilizan más (2). Como corolario, una tendencia mundial hacia lo natural se está desarrollando actualmente.

Una característica importante de los colorantes de origen natural, y que los hace de suma importancia principalmente para el mercado de la exportación de productos alimentarios, es que la mayoría de los colorantes de origen natural están exentos de la verificación realizada por FDA (Food and Drug Administration) que es exclusiva de colorantes certificados (2).

1.3 BETALAINAS.

Los pigmentos presentes en el betabel, son conocidos con el nombre de betalainas. Este grupo puede ser subdividido en dos: los de coloración roja denominados betacianinas y las betaxantinas de color amarillo; las betacianinas a diferencia de las betaxantinas, son compuestos que presentan resonancia debido a sus sistemas saturados los cuales se encuentran entre sí conjugados y absorben dentro de la región del U.V visible (400-800 nm). La betanina es el pigmento rojo mayoritario de las betacianinas, contribuyendo del 75 al 95% del color rojo contenido en el betabel (18). Las betacianinas han adquirido importancia a través del tiempo ya que resultan una fuente natural del color capaz de sustituir a los tintes rojos sintéticos (4). Estos pigmentos por su baja toxicidad pueden ser utilizados para el consumo humano en diversos productos: leche fermentada, yoghurt, bebidas en polvo, panadería, inclusive productos farmacéuticos (13).

El betabel nombre vulgar "*Beta-vulgaris*" es una planta perteneciente a la familia de las chenopodiaceae, de la especie correspondiente al orden centrosperma (26) y es considerada como una leguminosa. Los sólidos totales del betabel están formados principalmente por carbohidratos en un 80%, cenizas en 8%, proteína cruda 10% y contenido de betacianinas de 0.2-1% (26). Comúnmente cuando se extraen betalainas se piensa en el betabel, entre otros vegetales y plantas que contienen este pigmento. El betabel, (*Beta-vulgaris*) es una fuente potencial de valiosos pigmentos solubles en agua, llamados betalainas para ser usados como colorantes en alimentos (13).

Tradicionalmente se habla de la inestabilidad de las betalainas bajo diversos factores físicos, que incluyen: pH, temperatura, concentración de oxígeno y luz (1, 3, 22), y múltiples estudios sobre la estabilidad de las betalainas se han realizado con anterioridad (10, 11, 13, 17, 20). Por consenso general se sabe que es difícil trabajar con las betalainas, pero también se ha demostrado, que trabajando bajo las condiciones adecuadas se pueden obtener resultados favorables (3, 13, 17).

Las plantas que contienen a las betalainas, tienen colores similares a los colores presentados por las plantas que contienen antocianinas. Las betalainas, son un grupo de pigmentos, rojos y amarillos y que no son tan afectados por efecto del pH como los son las antocianinas; son solubles en agua y existen dentro de las vacuolas de las células como sales (zwitteriones). La presencia de las

betalainas dentro de las plantas, es mutuamente exclusiva de la presencia de las antocianinas (21). Anteriormente se pensaba que las betalainas tenían estructura de antocianinas, pero se demostró que tales pigmentos entre sí, no guardan ninguna similitud ya que las betalainas contienen un núcleo indólico y una piridina y por su parte las antocianinas se constituyen del grupo flavilio o benzopirilio (26). La fórmula general de las betalainas (Fig.1) representa la condensación de una amina primaria o secundaria con el ácido betalámico (Fig.2).

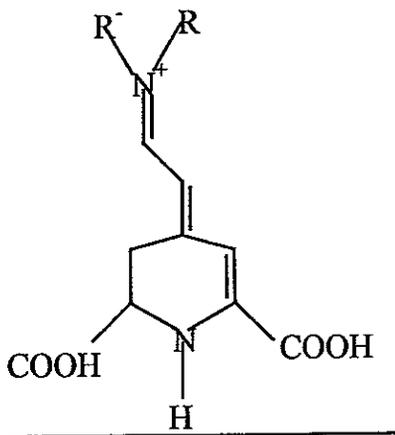


Figura 1. Fórmula general de las betalainas (20).

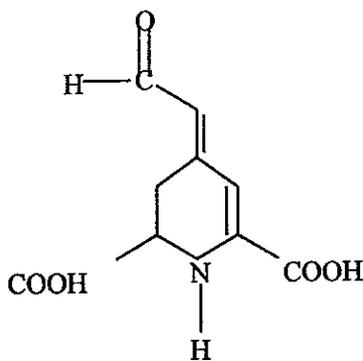


Figura 2. Ácido betalámico (20).

Las betalainas son químicamente aminas sustituidas (9) mezcla de compuestos rojos y amarillos que presentan sistemas protonados descritos como 1,2,4,7 pentasustituidos 1,7-diazoheptameros (Fig.3).

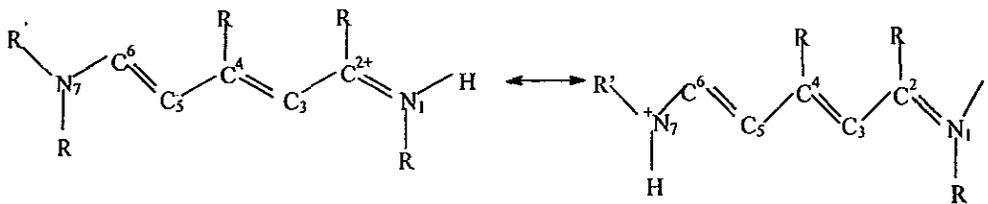


Figura 3. Cati3n diazoheptamero(20).

Cuando el grupo "R" no extiende su conjugaci3n del sistema 1,7-diazoheptameros, el compuesto exhibe una absorci3n m3xima a 480 nm, caracterstica de los compuestos amarillos bataxantinas; si la conjugaci3n se extiende hasta el grupo "R" se detecta una absorci3n a 540 nm caracterstica de los betacianinas (21).

Las betacianinas son 3pticamente activas debido a sus dos carbonos quirales, C-2 y C-15. La hidr3lisis de las betacianinas conduce a formar las betaninas o su epimero en C-15, isobetanidina o a una mezcla de ambos aglicones (21). Las diferencias entre las betacianinas son precisamente entre sus grupos glucosidicos. Las betalainas absorben fuertemente el espectro luminoso. El valor del coeficiente de absortividad molar tiene un valor de ($A^{1\%}$) 1120 para la betaninas y 750 para la vulgaxantina, lo cual sugiere que estos pigmentos tienen un alto poder colorante en estado puro. El espectro de la betanina en soluciones de pH entre valores de 4.0-7.0 no presenta cambios y exhiben una absorbancia m3xima a 536-538 nm; por debajo de valores de pH de 4.0 la absorci3n m3xima se presenta por debajo de los 535 nm y a valores de pH por arriba de 7.0 la absorci3n m3xima se da arriba de 539 nm (21).

1.4 ENZIMAS EN ALIMENTOS

En el año 1874 Christian Hansen químico danés, utilizó un extracto de renina para la elaboración de queso; este evento marcó la era moderna de la tecnología enzimática (18). El mercado mundial de la industria de las enzimas esta calculado en \$625 mmd; cerca del 62% de las enzimas producidas tienen su aplicación en procesos alimentarios. Tres son las ventajas principales en el uso de enzimas: reacción específica, condiciones de operación no violentas, alta productividad (18).

Tabla 1-Comparación de los procesos químico y Enzimático (13).

Proceso Químico	Proceso Enzimático
Muy agresivo	Poco agresivo
Muchos productos de reacción indeseables	Pocos productos de reacción indeseables
Difícil de controlar	Fácil de controlar
Sintético	Natural
Tradicional	Nuevo

Las enzimas utilizadas en la industria alimentaria difícilmente son enzimas cristalizadas, químicamente puras, mucho menos proteínas puras. Estos preparados comerciales contienen impurezas las cuales no interfieren con su actividad. El más común de los contaminantes presentes en los preparados enzimáticos comerciales lo constituyen moléculas inactivas de la misma enzima. Una enzima que sea utilizada comercialmente, deberá tener un costo bajo, con respecto al costo total del proceso dentro del cual esta siendo aplicada la enzima (28).

Por otro lado es importante también resaltar, que una enzima comercial deberá actuar óptimamente bajo las condiciones en las que se desarrolla el proceso alimentario (28). La mayoría de las enzimas comerciales funcionan durante la preparación y procesamiento del producto alimentario más que en etapas finales del mismo. El uso de enzimas en esta clase de procesos, presenta muchas ventajas ya que operan bajo condiciones de pH, temperatura etc. que son similares a las condiciones bajo las cuales el producto deseado es estable minimizando de esta forma, los requerimientos energéticos necesarios durante el proceso (28).

1.5 PECTINASAS, CELULASAS Y PROTEASAS.

Las **Pectinasas** son una mezcla de enzimas que pueden actuar sobre el sustrato pectina, polisacárido que se encarga de mantener la estructura de la pared celular de las células vegetales. El sustrato pectina, es un heteropolisacárido de aproximadamente 30'000-3000'000 de peso molecular y consiste básicamente de pectina, un polímero de ácido-D- galacturónico. Por lo menos el 75% de los monómeros del ácido-D- galacturónico están esterificados con metanol, o con galacturonas, arabinogalactanas y arabinanas (15).

Las enzimas que conforman el grupo de las enzimas pectinasas, son principalmente tres:

Pectinasas, también llamadas poligalacturonasas, encargadas de degradar el polímero formado por el ácido- D-galacturónico convirtiéndolo en oligosacáridos solubles. Estas enzimas están clasificadas como endoenzimas las cuales son capaces de cortar dentro de la cadena que forma el polímero y prefieren las pectinas de bajo metoxilo o la pectina completamente no esterificada.

Pectin-metil esterases, llamadas también pectin esterases, son capaces de hidrolizar el metanol de los grupos carboxilo esterificados y convertirlos en pectinas de bajo metoxilo y eventualmente hidrolizar todos los grupos esterificados del polímero.

Pectin-liasas, son endoenzimas que pueden funcionar actuando sobre el sustrato en forma aleatoria, hidrolizando grupos glicosídicos próximos a grupos metilo o grupos esterificados con metanol; estas enzimas prefieren los sustratos altos en contenido de grupos esterificados (15). Por su parte, las enzimas pectinasas comerciales son preparaciones que pueden contener todas las enzimas mencionadas anteriormente. El origen de éstas enzimas es fungal, tradicionalmente obtenidas de *Aspergillus niger* (15).

Al igual que las enzimas pectínicas, las **Celulasas** son una combinación de enzimas, de las cuales son tres las que se destacan por su acción:

Endoglucanasas, las cuales llevan a cabo el primer paso de la hidrólisis de la celulosa, actuando sobre regiones amorfas del polímero, como consecuencia de esto se forma el sustrato, que consiste en extremos libres de la celulosa, de otra importante enzima: la exobiohidrolasa o exocelulasa.

La **Exocelulasa** actúa sobre el extremo no reductor del polímero cortando compuestos llamados celobiosa disacárido formado por dos moléculas de glucosa unidas entre sí por un enlace β . Como

consecuencia de esto, más sustrato para la endoglucanasa es formado. La exocelulasa tiene la más alta afinidad por la celulosa.

Durante el accionar de las dos enzimas mencionadas anteriormente, se produce el sustrato para la tercera enzima del complejo: la **Celobiasa**. La Celobiasa actúa sobre la celobiosa. Este paso es muy importante, porque la acumulación de este producto inhibe por completo la hidrólisis de la celulosa (8).

Las **Proteasas** se clasifican de acuerdo a: su origen, su acción catalítica (endopeptidasas y exopeptidasas) y la naturaleza de su sitio activo.

Las **Endopeptidasas** son las Proteasas más comúnmente usadas en alimentos, pero en muchos casos su acción es suplida con las exopeptidasas (15). Las cuatro clases de endopeptidasas más importantes son: serina proteasas, cisteina proteasa, aspartico proteasa y metaloproteasas. Como su nombre lo indica, serina, cisteina y aspartico Proteasas tienen a la serina, cisteina y ácido aspartico, como su sustrato; éstos se encuentran formando la cadena "R" de cada residuo de la proteína. Si alguna de estas regiones se encuentra de algún modo bloqueada, entonces su acción es inhibida. La serina y cisteina Proteasas tienen su pH óptimo de acción cerca de 9, sin embargo puede actuar a un pH más bajos (pH: 5 y 6), aunque su actividad puede disminuir como consecuencia de lo anterior. Las metaloproteasas, contienen dentro de su estructura Zn, y tienen un pH óptimo cerca de la neutralidad. Por otro lado, estas enzimas son estabilizadas grandemente por el Ca^{2+} y agentes quelantes como el EDTA, las inhiben.

Por su parte las **Exopéptidasas**, no son tan comunes en los preparados comerciales, ya que la mayoría de ellas se encuentran dentro de las células o en la membrana celular. Dentro de las exopeptidasas se encuentran las carboxipeptidasas, que tienen como sustrato el grupo carboxilo de la cadena proteica. La mayoría de los extractos comerciales contienen a esta enzima (15).

2.-JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO.

En la industria de los alimentos, en particular la que produce colorantes naturales, se enfrenta al problema que representan los residuos del proceso general; en el caso del color rojo-violeta del betabel, en su mayoría los residuos están formados por el bagazo del betabel que pueden representar hasta el 50% del peso total de esta leguminosa (26).

El bagazo del betabel, es estructuralmente una red tridimensional formada por compuestos particulares del vegetal y que incluyen: celulosa, pectina, proteínas y agua como compuestos principales (12) y para la finalidad de este trabajo, también los más importantes. Las betalainas, compuestos solubles en agua, también están presentes en este residuo de extracción y que según experiencias, es complicado obtener el colorante que está presente en el bagazo del betabel (12). Al examinar químicamente los compuestos que conforman al bagazo y la problemática que representa las pérdidas de color por el no aprovechamiento de este residuo, se plantea una solución muy simple que tiene que ver con la biotecnología y que es el uso de enzimas para lograr extraer el color atrapado (28). Para el caso específico de este problema y tomando como base la composición química en el bagazo del betabel, las enzimas a utilizar, serán: Celulasas, Pectinasas (5) y Proteasas.

Las betalainas son compuestos que tienen la capacidad de establecer puentes de hidrogeno con diversos compuestos. Las proteínas tienen dentro de su estructura grupos amino y grupos carboxilo, que pueden establecer interacciones del tipo puente de hidrogeno (6). Estas interacciones provocan dificultad para separar o aislar a los compuestos que establecen el tipo de relación señalada anteriormente; además las proteínas tienen un grupo "R" que según su estructura también pueden establecer puentes de hidrogeno con las betalainas (6).

Por otro lado, la celulosa es un polímero de D-Glucosa; la estructura de la celulosa es una secuencia lineal de este compuesto, unidos por enlaces 1,4-glucosídicos. La celulosa difiere de la amilosa del almidón en que todas las configuraciones glucosídicas son β , (19) formando una red dentro de la cual queda atrapada agua y como consecuencia de esto también betalainas. Las pectinas, están presentes en la pared celular; químicamente las pectinas también son polímeros que están formados por ácido- D-galacturónico, unidos con enlaces α 1-4; este polímero esta esterificado en mayor o

menor grado, dependiendo de su naturaleza, por metanol a través de un enlace éster.

Por otra parte las betalainas, solubles en agua, se encuentran dentro de las vacuolas de las células de las plantas, las cuales están protegidas por la pectina (21) que esta presente formando una pared protectora que aísla a las células del medio que las rodea y permite que la célula pueda interactuar en el sistema. Wasserman (27) y su grupo de colaboradores, propusieron el uso de enzimas para la extracción del color atrapado en el betabel; utilizaron enzimas Pectinasas y Celulasas, sin embargo no tuvieron buenos resultados, ya que no solo no recuperaban el color sino que este, se degradaba casi por completo. La utilización de enzimas puede tener efectos contrarios a los planteados en el inicio de una investigación; su modo de acción no esta completamente definido y más importante, no se sabe si su catálisis pueda generar a su vez reacciones que traigan como consecuencia resultados adversos a los que se esperaban (27).

Investigaciones encaminadas al mejor entendimiento de la acción de enzimas sobre un sustrato específico se están realizando, con el objetivo de entender mejor su actividad y con ello optimizar resultados (5). Múltiples problemas se han presentado a la investigación científica, cuando esta trata de develar los secretos de la naturaleza y comúnmente, la solución planteada inicialmente no suele ser la correcta después de llevarse a cabo.

La estrategia planteada en este trabajo, es la utilización de enzimas comerciales: Pectinasas, Proteasas y Celulasas, de tal forma de encontrar las condiciones óptimas en cuanto a pH, temperatura y concentración de enzima, bajo las cuales se pueda efectuar la extracción del color rojo-violeta contenido en el bagazo del betabel sin que este se degrade. Posteriormente, si de la etapa anterior se pueden obtener resultados positivos, se propone seleccionar los parámetros adecuados de tal forma que se pueda establecer un sistema enzimático, combinando las enzimas mencionadas, que permita obtener los mejores resultados en la extracción del color, que los posibles resultados obtenidos usando las enzimas por separado.

**"Nada ocurre sin ser antes,
un sueño"**

Carl Sandburg.

OBJETIVOS.

3.- OBJETIVOS

- Determinar las condiciones óptimas para efectuar la extracción enzimática de las betalainas presentes en el bagazo del betabel, utilizando enzimas: Proteasas, Pectinasas y Celulasas.
- Establecer el sistema enzimático, (combinación de enzimas) que permita obtener un rendimiento mayor al 35% con respecto al color presente inicialmente en el bagazo de betabel.

4.- MATERIAL Y MÉTODOS.

4.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

En la figura 4 se muestra en forma general el esquema de trabajo para alcanzar los objetivos propuestos. Durante la investigación se trabajó con betabeles enteros (*Beta-vulgaris*) de la variedad Perfect Detroit, los cuales se mantuvieron en refrigeración hasta el momento en que fueron requeridos. Los betabeles fueron renovados cada tres semanas, y antes de su procesamiento, fueron lavados con agua corriente para eliminar materia extraña. Para obtener particularmente el bagazo, que fue el sustrato de las enzimas comerciales utilizadas, el betabel fue sometido a un proceso de extracción del cual se obtuvieron, por una parte, el jugo de betabel y por la otra el bagazo, que se utilizó inmediatamente; para cada determinación se realizó la extracción y el bagazo que no se utilizó, fue desechado.

La caracterización química del betabel, se realizó mediante un análisis proximal; se determinaron: Humedad, Proteína, Extracto etéreo, Carbohidratos totales, Fibra Cruda y Cenizas mediante métodos oficiales (16). Con la finalidad de tener un conocimiento más amplio de la composición química del bagazo de betabel, se realizó también sobre el mismo, las determinaciones antes señaladas.

Las mediciones correspondientes al contenido de betalainas se efectuaron espectrofotométricamente, determinando previamente la longitud de onda de máxima absorción de las betalainas en la región del U.V. visible (400-800 nm). La determinación se realizó corriendo una muestra de jugo de betabel, de concentración 1×10^{-3} g/ml, a lo largo de la región del visible, utilizando un espectrofotometro. Esta determinación tiene el objetivo de conocer la longitud de onda más adecuada para conocer el contenido, en este caso de betalainas, de las muestras obtenidas en posteriores experimentos.

Como consecuencia de los objetivos propuestos al inicio de la investigación, se decidió utilizar las siguientes enzimas: Celulasa, Pectinasa y Proteasa. Tres productos comerciales fueron utilizados en este trabajo (ENMEX S.A DE C.V); estos contenían a las enzimas señaladas con anterioridad y se procedió a efectuar su caracterización la cual consistió en conocer el contenido de proteína de las

enzimas utilizando el método de Biuret. Por otro lado también se realizó la determinación de la actividad enzimática de cada una de las enzimas seleccionadas. Lo anterior se hizo buscando el sustrato más adecuado para cada una de las enzimas y cuantificando su actividad por métodos espectrofotométricos.

Para el caso de la enzima Proteasa se utilizó el método de Biuret y para las enzimas Celulasa y Pectinasa se utilizó la técnica del ácido 3,5-dinitrosalisílico (24). Para estos experimentos se fijaron las condiciones de: Temperatura, pH conforme a indicaciones recomendadas por los proveedores, así como la concentración de enzima en 5% p/v, que también fue una recomendación. Todas las concentraciones de enzima en los diferentes experimentos se manejaron en términos de % p/v.

Se realizó una cinética enzimática con cada una de las enzimas seleccionada; se decidió trabajar a 30°C y pH 5 y 7, 40°C y pH 5 y 7 y 50°C y los mismos valores de pH con el objetivo de establecer las condiciones de temperatura y pH óptimos de las enzimas; en esta etapa la concentración de enzima se fijó en 5% p/v con respecto al sustrato el cual fue el bagazo de betabel. El tiempo seleccionado para evaluar la actividad de las enzimas fue 10 minutos. Este tiempo se consideró adecuado para poder evaluar la actividad de las enzimas. Al término de este periodo, las enzimas se inactivaron con calor y se cuantificó el color liberado del bagazo como consecuencia de la actividad enzimática. La cinética desarrollada pretendió establecer el comportamiento de las diferentes enzimas seleccionadas, en presencia de un sustrato particular, en este caso el bagazo del betabel, teniendo a esta como su única finalidad. Posteriormente, una vez seleccionadas la temperatura y pH óptimos, se evaluó la concentración de enzima dentro del sistema enzima-sustrato y se determinó la concentración más adecuada para él sistema. Por cuestiones de costo-beneficio, la concentración máxima a utilizar fue de 5% p/v con respecto al sustrato.

El proceso al que fue sometido el betabel antes de su interacción con las enzimas, consistió en extraer el jugo del betabel mediante un extractor de jugos y separar de este el bagazo que sirvió como sustrato. Cada determinación se realizó por separado y por duplicado.

Es importante señalar que investigaciones anteriores (27) han mencionado la presencia de una enzima con características que permiten suponer que tiene actividad de peroxidasa, y que provoca pérdida de color cuando se trata de extraer color del betabel entero, cuando han utilizado enzimas

Pectinasas y Celulasas, para esta finalidad. Esta investigación no pretende pasar por alto este suceso, y se propone establecer soluciones alternas que permitan evitar el problema citado, si se presenta, con la finalidad de alcanzar los objetivos establecidos al inicio de este trabajo. Se propone establecer alternativas tales como el uso de inhibidores específicos o en su defecto el uso de otras enzimas que contribuyan a la resolución de la problemática en cuestión.

La siguiente etapa de la investigación, consistió en establecer un sistema enzimático que permitiera obtener mejores resultados en cuanto a rendimientos en el contenido de color recuperado, que los resultados que pudieran obtenerse al trabajar con las enzimas en forma separada. En esta etapa se manejaron combinaciones de concentraciones de las enzimas seleccionadas, estableciendo dichas combinaciones de los valores de concentración de las enzimas que mostraron las mejores tendencias, cuando se evaluó el comportamiento de éstas en forma aislada. La temperatura y el pH utilizados en esta etapa fueron aquellos dentro de los cuales las enzimas mostraron su mejor desarrollo.

Finalmente se realizó un escalamiento del sistema óptimo encontrado en etapas anteriores, de tal forma de evaluar los rendimientos obtenidos cuando los volúmenes dentro del sistema propuesto aumentaban, estimando así su aplicabilidad a modelos más cercanos a la realidad práctica. Se planteó realizar un escalamiento 5 veces mayor al sistema utilizado inicialmente

DIAGRAMA DE TRABAJO.

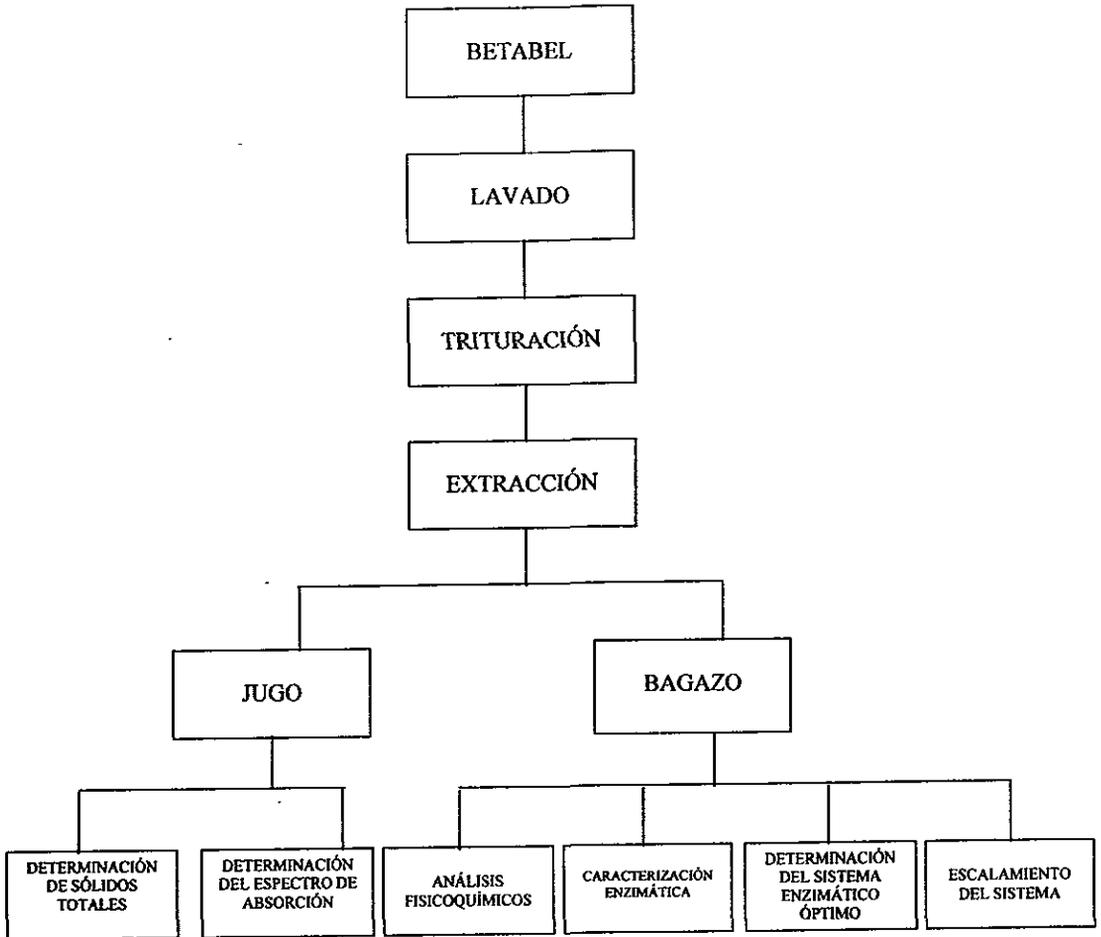


Fig.4. Metodología del trabajo experimental.

4.2- MÉTODOS DE ANÁLISIS.

Determinaciones Fisicoquímicas.

Análisis para el betabel entero y bagazo de betabel:

-Determinación de Proteína: Método kjeldahl (16).

-Determinación de Extracto etéreo: Extracción con éter de petróleo (16).

-Determinación de Cenizas: Método de la AOAC (16).

-Determinación de Humedad: Método de la AOAC (16).

-Determinación de Fibra cruda: Este método consiste en lo siguiente: se pesan 2 gramos de muestra seca y se colocan junto con 1 gramo de fibra de vidrio en un vaso Bersellius; se agregan 200 ml de ácido sulfúrico al 1.25% hirviendo, y se calientan a ebullición durante 30 min. (la solución debe empezar a hervir antes de 1 minuto) el contenido de este vaso se filtra al vacío utilizando un kitasato y un matraz erlenmeyer; el filtrado se lava tres veces con 200 ml de agua destilada calentada a ebullición; posteriormente, se traspasa el filtrado a otra vaso Bersellius, con 200 ml de NaOH al 1.25% hirviendo y se calienta a ebullición durante 30 min., a la muestra se le realiza el mismos lavados anteriormente señalados. Después de que la muestra se ha filtrado al vacío, se pone en un crisol a peso constante y se coloca 1hr. a 100°C en estufa; se deja enfriar y se pesa; el crisol se coloca en la mufla a 550°C, durante 3hrs. se deja enfriar y se pesa. El contenido de fibra cruda se calcula de la siguiente forma:

$$\%FC = \frac{\text{Peso del crisol después de secar} - \text{peso del crisol después de incinerar}}{\text{Peso de la muestra}}$$

-Determinación de Carbohidratos totales: Método de la AOAC (16).

Determinación del espectro de Absorción.

Para determinar el espectro de máxima absorción de las betalainas se efectuó la extracción del jugo de betabel utilizando un extractor de jugos (ver anexo). Posteriormente se pesó 0.1 g de jugo de betabel, el cual se disolvió con 50 ml de agua destilada; la muestra se pasó por papel filtro del N° 1 y se aforó a 100 ml. Utilizando un espectofotómetro y cubriendo toda la región del U.V. visible, se corrió la muestra citada con anterioridad y se comprobó la longitud de máxima absorción de las betalainas. La determinación realizada permitió encontrar el valor de longitud de onda adecuado, que se procedió a utilizar en etapas posteriores de este trabajo. Todas las pruebas se realizaron por duplicado y los resultados mostrados son el promedio de dos determinaciones.

Determinación de Proteína en los extractos enzimáticos por el método de Biuret.

Para determinar el contenido de Proteína en los extractos enzimáticos utilizados en este trabajo, se preparó una solución con albúmina de bovino de concentración 1 mg/ml, la cual fue usada como solución patrón. Fueron preparadas seis muestras con 1, 2, 4, 6, 8 y 10 ml de esta solución y un blanco que no contenía Proteína. A todas las muestras se les adicionó 4 ml del reactivo de Biuret y se ajustó el volumen a 15 ml utilizando agua destilada. Después de 30 minutos, se tomaron las lecturas de absorbancia a 540 nm correspondientes a cada una de estas.

Para conocer el contenido de Proteína de los extractos enzimáticos, se procedió a pesar por separado 0.05 g de cada una de las enzimas utilizadas, para este caso Pectinasa, Proteasa y Celulasa, y se disolvieron en 10 ml de agua destilada. Se agregó a cada muestra 4 ml del reactivo de Biuret y se dejaron reaccionar durante 30 minutos. Al término de este periodo, se tomaron las lecturas correspondiente de absorbancia a 540 nm. Todas las pruebas se realizaron por duplicado y los resultados mostrados son el promedio de dos determinaciones.

Determinación de la actividad específica de la Celulasa (5, 8, 15).

La actividad de la enzima Celulasa se determinó midiendo azúcares reductores dentro de un sistema que incluye el sustrato y la enzima estudiada para cada caso, mediante la técnica de D.N.S. Se preparó una solución de glucosa anhidra U.S.P. de concentración 2×10^{-3} g/ml la cual se utilizó para preparar una curva de calibración de azúcares reductores. Se prepararon seis muestras que contenían 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 ml de solución patrón de glucosa; a cada una se les adicionó 1 ml del reactivo D.N.S. y después de someterlas a ebullición durante 5 minutos, se enfriaron y se aforaron a un volumen final de 50 ml. Por último se tomaron las correspondientes lecturas de absorbancia a 540 nm .

El sustrato para la enzima Celulasa fue Carboximetilcelulosa (CMC) de Sigma; La CMC, no es soluble en agua, así que se preparó una suspensión al 0.01%. Cabe señalar que para mantener homogénea la suspensión, las alícuotas antes de ser adicionadas se agitaron 5 veces a la izquierda y 5 veces a la derecha. Para determinar la actividad específica de la enzima Celulasa se preparó una solución de esta enzima de concentración 1×10^{-3} g/ml utilizando solución amortiguadora de acetatos pH:5 (ver preparación de soluciones) esta solución también se utilizó para preparar la dispersión de Carboximetilcelulosa .Se procedió a preparar seis muestras que contenían cada una 2 ml de la solución con la enzima Celulasa y 2ml de la suspensión de CMC. Las muestras se mantuvieron durante los siguientes tiempos de reacción: 2, 4, 6, 8, y 10 minutos a 30°C en un baño con agua a temperatura constante, considerando cero como punto de inicio del experimento. Al término de los tiempos mencionados, se tomó 1 ml de cada una de las muestras y se les adicionó 1 ml del reactivo D.N.S., las muestras se calentaron a ebullición durante 5 minutos, se enfriaron y se aforaron a 50 ml con agua destilada; se tomaron las correspondientes lecturas a 540 nm. Se determinó el contenido de azúcares reductores en mg/ml. La actividad específica de la enzima es igual a la pendiente de la curva mg/ml de azúcares reductores vs. tiempo de reacción. Todas las pruebas se realizaron por duplicado y los resultados mostrados son el promedio de dos determinaciones.

Determinación de la actividad específica de la Pectinasa (5, 8, 10, 15).

También para la determinación de la actividad de la enzima Pectinasa se midieron azúcares reductores dentro de un sistema que incluyó el sustrato y la enzima Pectinasa, mediante la técnica de D.N.S. El sustrato para la enzima Pectinasa fue Pectina de alto metoxilo U.S.P. con el cual se preparó una solución con 1×10^{-2} g/ml en sol. amortiguadora de acetatos pH 5. Una solución de enzima Pectinasa de concentración 1×10^{-3} g/ml fue preparada en un buffer de acetatos. Se procedió a preparar seis muestras que contenían 2 ml de solución enzimática y 2 ml de sustrato; las muestras se mantuvieron por 2, 4, 6, 8 y 10 minutos a 30°C se utilizando un baño con agua a temperatura constante. Después de esto, se tomó 1 ml de cada una de las muestras se les agregó 1 ml del reactivo D.N.S. y se calentaron a ebullición durante 5 minutos, se enfriaron y se aforaron a 50 ml con agua destilada; como en el caso anterior, las lecturas correspondientes de absorbancia a 540 nm fueron tomadas, y se determinó el contenido de azúcares reductores en mg/ml. La actividad específica de la enzima Pectinasa, es igual a la pendiente de la recta mg/ml de azúcares reductores vs. tiempo de reacción. Todas las pruebas se realizaron por duplicado y los resultados mostrados son el promedio de dos determinaciones.

Determinación de la actividad específica de la Proteasa (5, 8, 15).

La actividad específica de la enzima Proteasa se determinó midiendo la cantidad de Proteína hidrolizada y cuantificada por el método de Biuret. El sustrato para la enzima Proteasa fue albúmina de bovino de Merck. Se procedió a preparar el sustrato para la enzima con concentración 1×10^{-2} g/ml utilizando sol. amortiguadora de acetatos pH:5 y también se disolvió la enzima hasta una concentración 1×10^{-3} g/ml con la misma solución. Se preparó un baño con agua a temperatura constante e igual a 30° centígrados y se procedió a preparar seis muestras que contenían 2 ml de la sol. enzimática y 2 ml del sustrato, albúmina de huevo; las muestras se mantuvieron por separado los siguientes tiempos de reacción: 2, 4, 6, 8 y 10 minutos a 30°C tomando cero como inicio del experimento. Después de lo anterior se tomó 1 ml de cada una de las muestras, se agregó 4 ml del reactivo de Biuret y se calentó durante 5 minutos; las muestras se enfriaron y aforaron a 25 ml con agua destilada; 30 minutos más tarde, se tomaron las lecturas de absorbancia correspondientes a cada muestra a 540 nm y se determinó el contenido de Proteína en mg/ml. La actividad específica de

la enzima es igual a la pendiente de la curva mg/ml de Proteína vs. tiempo de reacción. Todas las pruebas se realizaron por duplicado y los resultados mostrados son el promedio de dos determinaciones.

Determinación de la temperatura óptima de las enzimas.

Para la determinación de la temperatura óptima, se fijó por recomendaciones del proveedor en 5% p/v la concentración inicial de cada enzima para trabajar esta etapa, así como también por especificaciones del mismo, en esta etapa se trabajó con un pH de 5.00 utilizando solución amortiguadora de acetatos (ver preparación de reactivos). La concentración del sustrato enzimático en este caso el bagazo del betabel, se fijó en 0.05 g/ml. Se trabajó con un volumen final de 10ml utilizando tubos de ensaye. Se realizaron monitoreos de la hidrólisis enzimática a las siguientes temperaturas: 30, 40 y 50 °C; evaluando resultados a los 0, 5, 10, 20, 30, 45 y 60 minutos de hidrólisis; esto se hizo con cada una de las enzimas por separado. Después de los tiempos mencionados, las muestras se calentaron a ebullición durante 5 minutos para inactivar a las enzimas, se enfriaron y se pasaron por papel filtro del N° 1; se tomaron las correspondientes lecturas de absorbancia a la longitud de onda adecuada. Todas las pruebas se realizaron por duplicado y los resultados mostrados son el promedio de dos determinaciones.

Determinación del pH óptimo de extracción.

Se trabajó con una concentración de enzima de 5% p/v y de la etapa anterior, se seleccionó la temperatura óptima de cada enzima y se trabajó con esta durante la extracción. La concentración del sustrato de las enzimas se fijó en 0.05 g/ml y un volumen final fue 10ml, utilizando tubos de ensaye. Se procedió a evaluar la capacidad hidrolítica de las enzimas a pH 5 y 7, y se realizaron monitoreos a los 0, 5, 10, 20, 30, 45 y 60 minutos de hidrólisis; lo anterior se efectuó con cada una de las enzimas y por separado. Al término de cada uno de los tiempos mencionados, las muestras se calentaron a ebullición durante 5 minutos para inactivar las enzimas, se enfriaron utilizando un baño con agua corriente y se pasaron a través de papel filtro del N° 1; se tomaron las correspondientes lecturas de absorbancia a la longitud de onda adecuada. Todas las pruebas se realizaron por duplicado y los resultados mostrados son el promedio de dos determinaciones.

Determinación de la concentración óptima de enzima.

De etapas anteriores, se seleccionó la temperatura y pH óptimos para cada una de las enzimas. La concentración del sustrato nuevamente se fijó en 0.05 g/ml y el volumen final fue 10 ml. Las concentraciones de enzima seleccionadas fueron: 0, 0.5, 1, 2, 3, 4 y 5 % p/v. Para cada una de estas concentraciones, se evaluó la capacidad enzimática después de 10 minutos de hidrólisis y al término de este, las muestras se calentaron a temperatura de ebullición durante 5 minutos para inactivar las enzimas. Las muestra se enfriaron con agua corriente y se pasaron por papel filtro del N° 1; después de lo anterior, se tomaron las correspondientes lecturas de absorbancia a la longitud de onda adecuada. Todas las pruebas se realizaron por duplicado y los resultados mostrados son el promedio de dos determinaciones.

Determinación del sistema enzimático óptimo.

Una vez que se ha encontrado los parámetros antes mencionados, se procedió a determinar las concentraciones de enzimas mas adecuadas de tal forma de establecer un sistema enzimático con el cual se pudieran obtener mejores resultados que los posibles utilizando las enzimas en forma aislada, es decir se estableció un sistema enzimático encaminado a obtener el mejor rendimiento en cuanto a la extracción del color contenido en el bagazo de betabel.

**“Se sabe de hombres que buscan la soledad...
... o bien esperan durante meses o años ser agraciados
en su aislamiento con una revelación divina
que inmediatamente quieren difundir
entre los hombres”**

**“El Perfume”
*Patrick Süskind.***

RESULTADOS.

5. -RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Los resultados obtenidos después de realizar el análisis proximal al betabel entero, se muestran a continuación:

Tabla 2. Análisis proximal del betabel entero.

Componente	g/100 de muestra húmeda	g/100 de muestra seca
Proteína	2.74	16.16
Extracto etéreo	0.7	4.12
Cenizas	2.04	12.08
Fibra Cruda	1.65	9.75
Carbohidratos totales	9.76	57.88

Humedad: 83.13 g/100 de muestra húmeda.

Los resultados obtenidos del análisis proximal sobre el betabel, muestran un 16.15% de proteína, 9.75% de fibra cruda, además de un 57.88% de carbohidratos dentro de los cuales están contempladas las pectinas, y que para los fines de este trabajo, son los parámetros más importantes. El total de estos porcentajes alcanza la cifra de 86 % en base seca, esto quiere decir que un alto porcentaje del betabel es sobre el que se trabajó y en consecuencia una razón importante, que nos permitió sustentar la propuesta planteada al inicio del proyecto. Los valores reportados sobre la composición química del betabel, son similares a los encontrados en esta investigación; existen sin embargo, algunos valores como el contenido de cenizas, que difieren en cuanto a los reportados. Esta variación se puede atribuir a causas intrínsecas del propio betabel, cuyo desarrollo depende de factores climáticos y otros como tipos de fertilizantes usados durante su cultivo.

Tabla 3. Composición química del betabel (26)

Componente	g/100 de muestra húmeda
Humedad	85-90
Proteína	1.6
Extracto etéreo	0.1
Cenizas	1.1
Fibra cruda	0.9
Carbohidratos	9.6

Por otro lado, el proceso de extracción se efectuó después de someter a un lavado con agua corriente, los betabeles seleccionados de la especie Perfect Detroit. Este proceso se llevó a cabo mediante un extractor de jugos y se obtuvieron al final de este, el jugo que se utilizó para determinar el espectro de absorción y el bagazo del betabel, que sirvió como sustrato enzimático. El contenido de Proteína en el betabel es 16.16% (base seca), es decir mas de una cuarta parte del peso seco de la leguminosa, contiene potencialmente betalainas atrapadas dentro de su estructura.

-Espectro de absorción

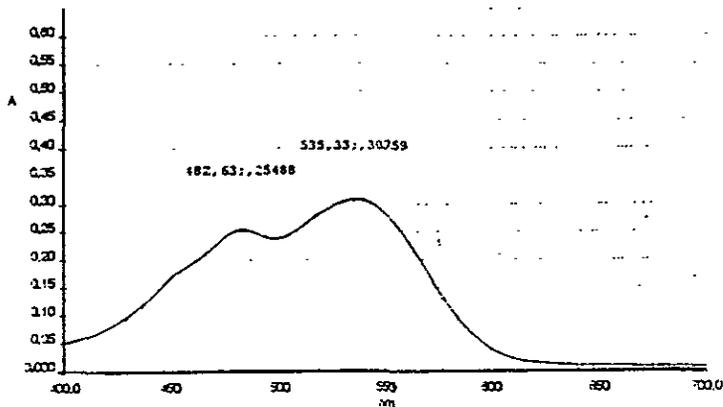
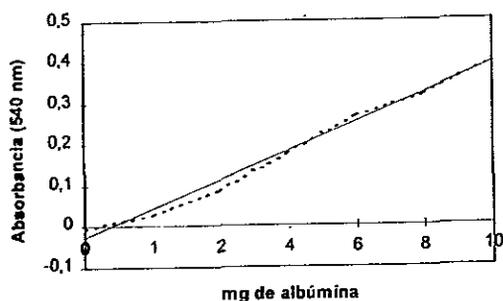


Fig. 5. Espectro de absorción del jugo de betabel.

El espectro de absorción del jugo de betabel se muestra en la figura 5. Se puede apreciar un máximo de absorción en la región del visible (400-800 nm), como era de esperarse; este punto se encuentra en 535 nm, que indican la longitud de onda de máxima absorbancia para la betalainas. Algunas referencias citan 540 nm como la longitud más adecuada para cuantificar betalainas, sin embargo, para este trabajo se realizaron las mediciones en 535 nm ya que fue este el valor encontrado después de efectuar la determinación que consistió en correr una muestra de jugo de betabel a lo largo de la región del visible y determinar su espectro de absorción.

Determinación de la actividad de las enzimas.

Curva de calibración para determinar contenido de proteína.



Datos	
Absorbancia	mg de albúmina
0	0
0,03	1
0,09	2
0,18	4
0,27	6
0,32	8
0,4	10

Fig.6. Curva de calibración para Proteína.

La curva de calibración para determinar Proteína proporcionó un coeficiente de correlación igual a $r=0.9959$ el cual es adecuado para efectuar las determinaciones correspondientes; la albúmina de bovino es fácilmente soluble en agua, a diferencia de otros patrones probados como los son la caseína, la cual no es soluble en este disolvente y por lo cual no se utilizó para efectuar la curva, o la albúmina de huevo, con la cual sucede lo mismo. Esta curva sirvió para calcular el contenido de Proteína de las enzimas además de ser utilizada para evaluar la actividad específica de la enzima Proteasa. Se determinó el contenido de Proteína de las enzimas utilizadas; los resultados se muestran a continuación en la tabla numero 4.

Tabla 4. Contenido de Proteína de las enzimas empleadas.

Enzima	Peso de la muestra (g)	Absorbancia (540 nm)	mg de Proteína/g de producto en polvo
Pectinasa	0.058	0.05	190.69
Proteasa	0.054	0.055	204.64
Celulasa	0.053	0.075	299.12

El contenido de Proteína de las enzimas es de importante relevancia, ya que establece un parámetro con el cual pueda identificarse la naturaleza de la enzima en caso de ser necesario. El siguiente paso fue preparar la curva de calibración que permitió conocer la actividad específica de las enzimas Celulasa y Pectinasa.

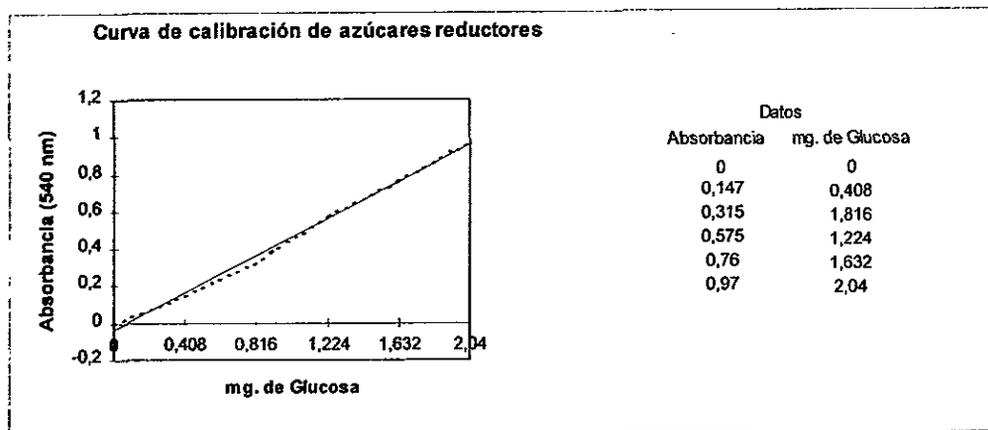
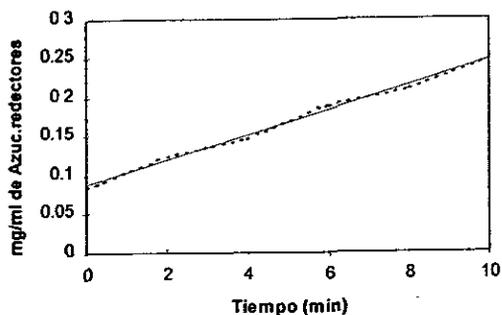


Fig. 7. Curva de calibración de azúcares reductores.

La figura 7 muestra la curva de calibración que fue utilizada para medir la actividad específica de las enzimas Celulasa y Pectinasa. Esta curva proporcionó un coeficiente de correlación $r=0.99504$, el cual indica linealidad adecuada dentro del intervalo manejado para su realización. Los valores del contenido de glucosa expresados en mg, se obtuvieron adicionando a diferentes volúmenes de la solución patrón de glucosa, 1 ml del reactivo D.N.S.; posteriormente las muestras se sometieron a un calentamiento a temperatura de ebullición durante 5 minutos para inactivar las enzimas. La técnica D.N.S. es la más recurrida para determinar azúcares reductores, y cuando se manejan polímeros, la cuantificación de glucosa es el cálculo más recomendado (24).

Determinación de la actividad de la enzima celulasa.

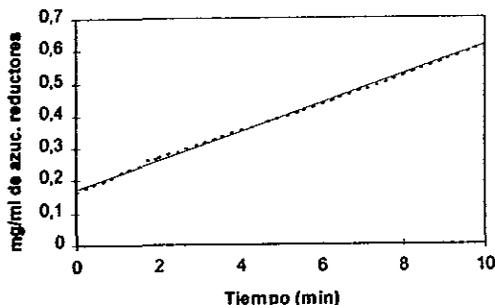


Datos	
mg de azuc. Reduc.	Tiempo (min)
0,083	0
0,125	2
0,146	4
0,19	6
0,21	8
0,246	10

Fig. 8. Determinación de la actividad de la Celulasa.

En la figura 8 se observa de la enzima Celulasa con respecto al tiempo; la pendiente de la curva mostrada en la figura 8, que es igual a 1.57×10^{-2} mg-gluc./ml-min., nos da la actividad de la enzima en cuestión; los azúcares reductores fueron cuantificados como glucosa, después de detener la reacción enzimática a los tiempos indicados en la figura 8 y de agregar a cada una de las muestras el reactivo D.N.S.; la reacción se detuvo calentando las muestras a temperatura de ebullición durante 5 minutos y la cuantificación se llevó a cabo por espectrofotometría. El sustrato utilizado para la enzima Celulasa fue CMC, la temperatura se mantuvo a 30°C y el pH fue 5. La determinación de la actividad de las enzimas se efectuó para tener un control sobre estas de tal forma de conocer sus características y también su naturaleza.

Determinación de la actividad de la enzima pectinasa

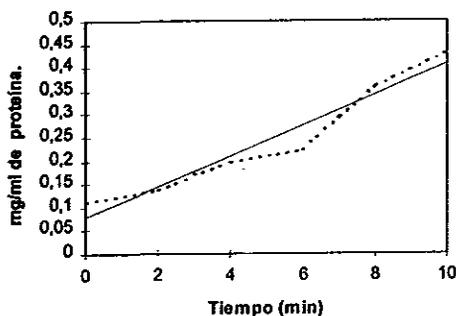


Datos	
mg de azuc. Reduc.	Tiempo (min)
0,165	0
0,27	2
0,356	4
0,435	6
0,525	8
0,615	10

Fig. 9. Determinación de la actividad de la Pectinasa.

Análogamente, como en el caso de la enzima Celulasa, para la enzima Pectinasa la actividad específica es $4,47 \times 10^{-2}$ mg-gluc/ml-min también en este caso los azúcares reductores fueron cuantificados como glucosa utilizando la técnica D.N.S. la reacción se detuvo a los tiempos indicados, el pH se mantuvo en un valor de 5 y la temperatura fue 30°C; después de efectuar un calentamiento sobre las muestra a temperatura de ebullición durante 5 minutos, se determinó la concentración de mg/ml de azúcares reductores, interpolando los valores obtenidos, utilizando la curva de calibración.

Determinación de la actividad de la enzima Proteasa



Datos	
mg de proteína	Tiempo (min)
0,112	0
0,137	2
0,198	4
0,223	6
0,358	8
0,432	10

Fig. 10. Determinación de la actividad de la Proteasa.

La gráfica 10 muestra la acción del extracto enzimático que contiene a la enzima Proteasa, con respecto al tiempo. Los datos de esta gráfica mostraron que la actividad específica de la enzima Proteasa es 3.25×10^{-2} mg-prot./ml-min. Para el caso de la enzima Proteasa, se usó el reactivo de Biuret para efectuar la determinación espectrofotométrica, que permitió obtener el contenido de Proteína de las muestras. Después de los tiempos señalados en la figura 10, se detuvo la reacción calentando a temperatura de ebullición por 5 minutos y después de 30 minutos, las muestras se analizaron en el espectrofotómetro a una longitud de onda igual a 540 nm. Esta información sirve como control de la naturaleza de la enzima.

Determinación de temperatura óptima de las enzimas.

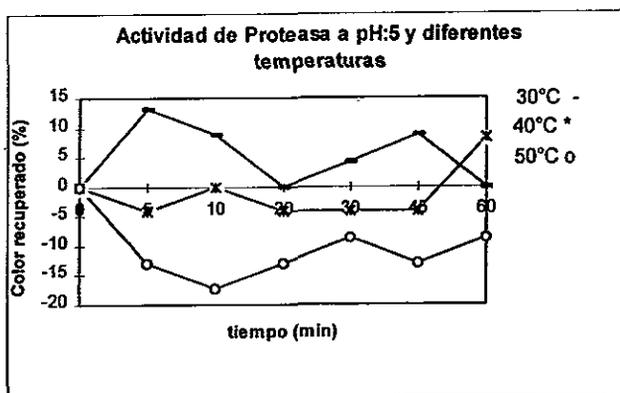


Fig. 11. Determinación de la temperatura óptima de reacción de la Proteasa.

La figura 11 muestra los resultados de la actividad de la enzima Proteasa en base a contenido de color recuperado del bagazo de betabel a diferentes temperaturas y pH: 5. para este caso, así como más adelante en la investigación, para analizar un parámetro, se fijaron el resto de las variables involucradas en el sistema: pH, concentración de enzima y concentración de sustrato. Se puede decir que la temperatura adecuada en este experimento es 30° centígrados, como se puede apreciar a los 5 minutos de hidrólisis, y aunque los valores no son constantes a través del tiempo, si hay recuperación de color (14%).

Tanto a los 5 minutos como a los 45 minutos se observa los mejores rendimientos en cuanto al contenido de color recuperado; el tiempo de 45 minutos puede ser utilizado como tiempo para efectuar la extracción utilizando mezclas de enzimas.

Por otro lado ni a 40° ni a 50° grados centígrados se observan resultados positivos, ya que se pierde completamente el color, inclusive a los 5 minutos de haberse iniciado la hidrólisis; sabemos (3) que la temperatura de 40° centígrados no es precisamente la más adecuada para mantener la estabilidad de las betalainas, y por otro lado, la temperatura de 50° centígrados es definitivamente inadecuada para estos pigmentos. Esta puede ser la causa de los resultados no positivos encontrados en este experimento. El porcentaje de color recuperado, se determinó comparando las muestras contra un blanco (control) que fue sometido al mismo tratamiento, solo que no le fue adicionada la enzima en cuestión.

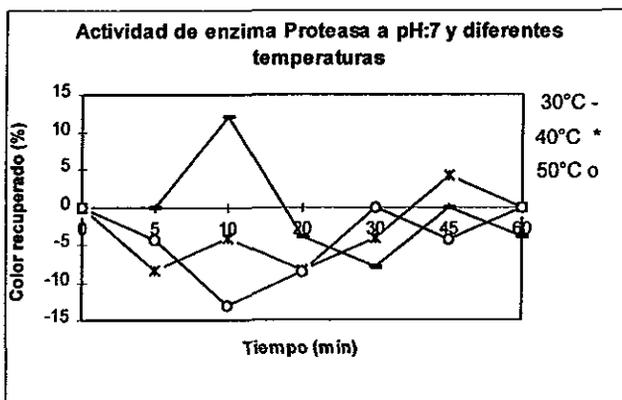


Fig. 12. Determinación de la temperatura óptima de reacción de la Proteasa.

La figura 12 muestra la actividad de la enzima Proteasa a diferentes temperaturas y pH:7. Como en los resultados mostrados en la figura 11, aunque no tan claramente, se puede observar que la temperatura recomendada para efectuar la extracción de los pigmentos betalainas, es 30° centígrados; sin embargo este experimento efectuado a pH:7, no es muy recomendable para la estabilidad de las betalainas (3). El trabajar a pH:7 sabiendo que este pH no es muy adecuado para los pigmentos rojos, se debió a que se tuvo que evaluar la extracción del color presente en el bagazo

del betabel a este pH, ya que es óptimo para la actividad de la enzima Proteasa, (ver introducción) de tal forma de ponderar cual era el efecto que prevalecería al final, el contenido de color extraído como consecuencia de la actividad de la enzima o la pérdida de color de las betalainas a pH:7. Las temperaturas de 40° y 50° centígrados, según la figura 12, no son adecuadas para la extracción del color, seguramente también por las razones comentadas con anterioridad.

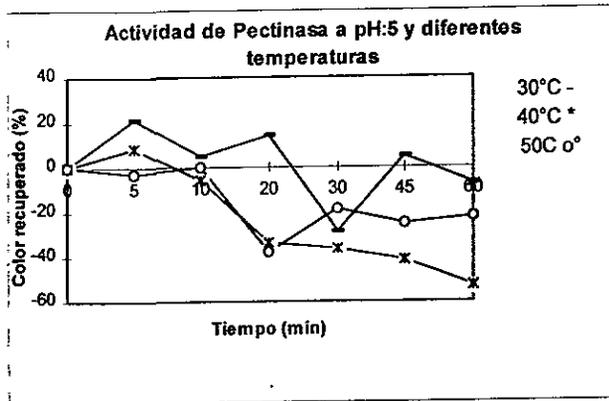


Fig. 13. Determinación de la temperatura óptima de reacción de la Pectinasa.

La figura 13 muestra la relación entre el color recuperado y actividad de la enzima Pectinasa a pH:5. El pH de este experimento, según la bibliografía, es el más adecuado tanto para la enzima, como para la estabilidad de las betalainas (10). Después de efectuar el experimento mostrado en la figura 13, la temperatura adecuada para extraer los pigmentos del bagazo de betabel fue 30° centígrados para la enzima comercial Pectinasa, no así 40° o 50° centígrados. Con respecto a estas temperaturas de trabajo, se puede sugerir lo mismo, que lo explicado para le enzima Proteasa, sin embargo, el proceso de degradación se establece desde el inicio de la extracción acresentandose a los 10 minutos de efectuada la hidrólisis a 50° centígrados y perdiéndose un 58% del mismo a los 60 minutos; se deduce que no es recomendable realizar la extracción del color a 50°C.

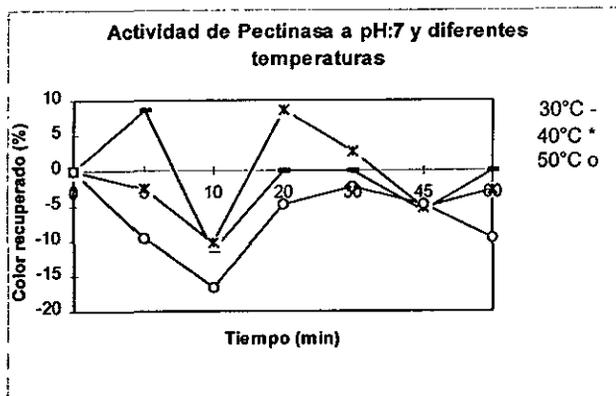


Fig. 14. Determinación de la temperatura óptima de reacción de la Pectinasa

Se puede observar en la figura 14, aunque no claramente, que a la temperatura de 30°C se puede extraer color utilizando la enzima Pectinasa; un 10% de color se recuperó cuando se trabajó en la temperatura mencionada. Nuevamente se observa que las temperaturas de 40 y 50° centígrados no son recomendables ya que el color se degrada por completo, como se observa a la temperatura de 50°C y 10 minutos de reacción; en este punto la degradación alcanza el valor de 17%.

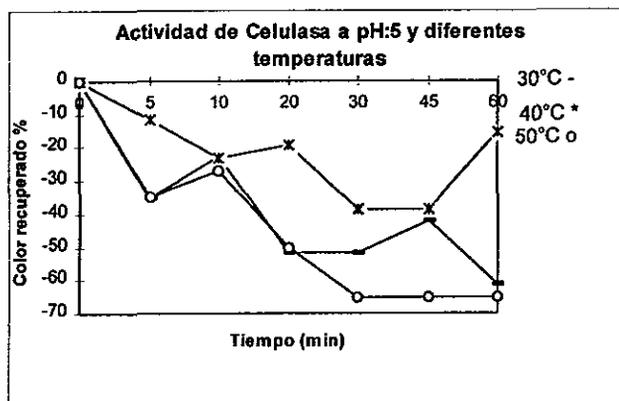


Fig. 15. Determinación de la temperatura óptima de reacción de la Celulasa.

En la figura 15 se evaluó la actividad de la enzima Celulasa a diferentes temperaturas y pH:5; definitivamente aquí no existen resultados positivos. Estos muestran que las betalainas son degradadas en cuanto la enzima Celulasa comienza a actuar y la degradación se incrementa con el tiempo; el máximo de degradación se presenta a la temperatura de 50° centígrados, temperatura adecuada para la enzima Celulasa (ver introducción) pero no recomendable para la estabilidad de las betalainas (10). Como consecuencia de la combinación de estos factores, aumenta considerablemente la pérdida del color. No hay recuperación de los pigmentos en ningún momento de la extracción.

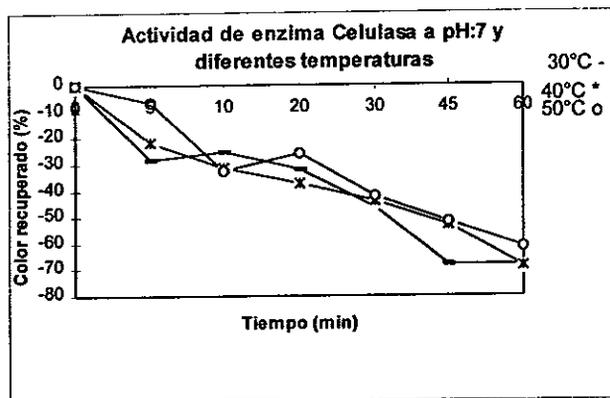


Fig.16. Determinación de la temperatura óptima de reacción de Celulasa

La figura 16, muestra que la extracción de los pigmentos betalainas definitivamente no es posible cuando se utiliza la enzima Celulasa, a temperaturas de 30°C, 40°C o 50°C y pH 7. Anteriormente, como se puede apreciar en la figura 15, la actividad de la enzima Celulasa sobre el bagazo de betabel, produce el efecto contrario al que inicialmente se pretendía, y por el cual se decidió utilizar. La degradación del color produce valores tan altos como 70% de color perdido, esto cuando se han efectuado 60 minutos de hidrólisis. En este experimento no se puede apreciar la influencia de la temperatura de reacción ya que solo se obtuvieron resultados negativos, los cuales a pesar de que se pueden comparar, no proporcionan información confiable.

Por otro lado, después de efectuar los experimentos mostrados en las figuras 15 y 16, se procedió a realizar un experimento mas con la enzima Celulasa, para comprobar si la misma tendencia encontrada hasta ahora, se seguiría presentando.

Seleccionamos, las siguientes condiciones:

- Temperatura: 30°.
- pH: 5.00.
- Tiempo de hidrólisis: 30 min.
- Concentraciones de enzima seleccionadas: 0, 0.5, 0.8, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 y 5.0 % p/v:

Se evalúa la actividad de la enzima Celulasa sobre el bagazo del betabel, en cada una de las concentraciones seleccionadas y se cuantifica la extracción del color contenido en el bagazo. Los resultados se muestran a continuación:

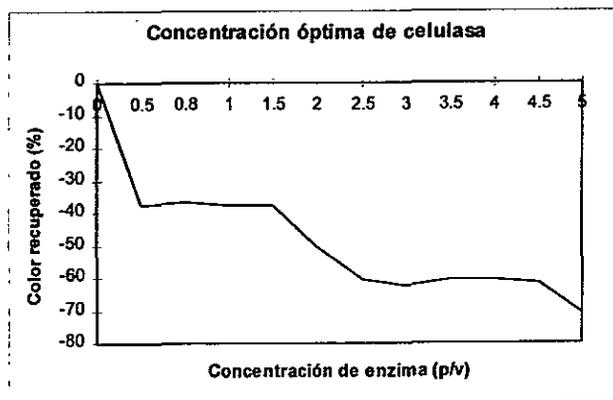


Fig. 17. Determinación de la Concentración óptima de Celulasa.

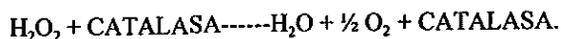
El experimento de la figura 17, se realizó para evaluar el efecto de la enzima Celulasa, a diferentes concentraciones, sobre el color presente en el bagazo de betabel. La figura muestra que al aumentar la concentración de enzima el efecto degradativo sobre las betalainas, también aumenta, lo cual confirma la relación entre el color perdido y la enzima Celulasa. Se puede observar que al adicionar 0.5 % de enzima Celulasa a la muestra que contiene el bagazo de betabel, se pierde cerca del 10 %

del color, y se pierde cerca del 70 % del mismo cuando se trabaja a una concentración de 5 %. De acuerdo con esto, la enzima Celulasa dentro del sistema, no provoca la liberación del color, sino todo lo contrario, lo degrada casi por completo. Las figuras 16 y 17 muestran que en la utilización de la enzima Celulasa para efectuar la extracción de los pigmentos rojos, existe un factor intrínseco de la enzima que provoca pérdida total del color en cuanto esta se pone en contacto con el sustrato seleccionado.

Anteriormente, Wasserman (27) y sus colaboradores intentaron extraer pigmentos del betabel entero utilizando enzimas, una de las enzimas más utilizadas en la experimentación antes mencionada fue precisamente una Celulasa. En este experimento, Wasserman (27) y colaboradores perdían por completo el color presente en el betabel cuando se ponía este en contacto con la Celulasa utilizada en su trabajo. Sin poder resolver por completo su problemática, Wasserman (27) y colaboradores sugirieron que podría existir una segunda enzima que sería la responsable de la degradación del color y que esta era liberada precisamente por la enzima Celulasa provocando con esto la pérdida del color. Wasserman habló de una enzima con actividad de peroxidasa como la causante directa de la problemática.

En este proyecto desde su inicio se planteó la utilización de la enzima Celulasa para lograr los objetivos planteados, pero al utilizar la enzima Celulasa no se obtuvieron los resultados esperados y tomando en cuenta el precedente (27), se plantea una solución alterna a estas instancias de la investigación. La pérdida del color contenido en el bagazo del betabel podría deberse a la liberación de una enzima con carácter de peroxidasa, la cual es liberada por acción de la enzima Celulasa utilizada en este proyecto. Sabemos (7) que las peroxidadasas presentes en el tejido vegetal actúan utilizando peróxido de hidrogeno (H_2O_2) durante su actividad. El peróxido de hidrogeno se encuentra en las células vegetativas (27) y es a partir de este compuesto que la enzima peroxidasa actúa.

La enzima Catalasa, catalisa la siguiente reacción:



Con la información obtenida durante la investigación podemos suponer que la acción de la enzima Celulasa sobre el bagazo del betabel libera una enzima o un sistema enzimático que degrada los pigmentos betalainas, ya sea porque estos sean sus sustratos o porque la acción de esta enzima libera algún metabolito que degrada el color. A partir de la información obtenida en los experimentos de Wasserman (27) y sus colaboradores y los resultados obtenidos en este trabajo con la enzima Celulasa, planteamos la siguiente alternativa:

Si la actividad de la enzima Celulasa libera una enzima o un sistema enzimático como consecuencia de su acción sobre el bagazo del betabel y esta enzima o sistema enzimático tiene actividad de peroxidasa, la presencia de la enzima Catalasa eliminará la acción de la peroxidasa ya que su afinidad por el peróxido de hidrogeno es mucho mayor que la afinidad que pudiera tener cualquier peroxidasa (7). Sin peróxido de hidrogeno las enzimas peroxidases no podrá actuar sobre las betalainas; si es así, la degradación de estas como consecuencia de la actividad de la peroxidasa, no se efectuará más.

Enzima Catalasa.

Características:

- Catalasa. Sigma C-3515 Lot.69f3778.
- Actividad: 7150 units/mg de Proteína.

La utilización de la enzima Catalasa en el experimento plantea de inicio algunas preguntas. Una de las principales es, ¿qué cantidad de enzima deberá ser adicionada para lograr el efecto inhibidor sobre la peroxidasa?. Varias alternativas se pueden plantear como respuesta, sin embargo se observa que la actividad de la enzima Catalasa es aproximadamente 100'000 mayor que la actividad de la enzima Celulasa. Una de las razones de esto es que la enzima Catalasa que se utilizó es prácticamente pura, a comparación de las enzimas comerciales que no lo son. Se plantea la alternativa de efectuar una dilución que permita igualar lo más posible las actividades de las enzimas en cuestión, es decir una dilución 1:100'000 para la enzima Catalasa, con el objeto de facilitar y economizar su uso, esto permitirá manejar de una forma más adecuada la enzima durante el proyecto además de que suponemos que la cantidad de enzima necesaria para efectuar la inhibición es mínima

como mínima debe ser también la cantidad de peroxidasa liberada por la acción de la Celulasa, no así su efecto sobre las betalainas. Planteamos desde un inicio como solución a la incógnita de no saber la concentración óptima de Catalasa necesaria para resolver el problema citado, la adición de un exceso de Catalasa en el sistema, de tal forma de encontrar más rápidamente la concentración de enzima adecuada. Se diseñó adicionar diferentes volúmenes de Catalasa al sistema manejando parámetros establecidos; estos son: pH 5, Temperatura: 30° centígrados, concentración de enzima 2.5% p/v, y 10, 15 y 20 minutos de hidrólisis, concentración de bagazo 0.05 g/ml.

Los resultados de estos experimentos se muestran a continuación:

Condiciones:

- 10 minutos de hidrólisis
- pH 4.95
- Temperatura 30°C

Tabla 5

ml de Catalasa agregados	Color perdido (%)
0	30
0.5	26.6
1	13.3
2	16.6
3	13.3
5	13.3
7.5	0

Condiciones:

- 15 minutos de hidrólisis
- pH 4.92
- Temperatura 30°C

Tabla 6

ml de Catalasa agregados	Color perdido (%)
0	44.4
0.5	55.5
1	55.5
2	55.5
3	55.5
5	27.7
7.5	0

Condiciones:

- 20 minutos de hidrólisis
- pH 4.96
- temperatura 30°C

Tabla 7

ml de Catalasa agregados	Color perdido (%)
0	42.8
0.5	42.8
1	50
2	50
3	28.5
5	21.4
7.5	0

En la tabla 5 podemos observar que después de agregar 3 ml de enzima Catalasa hay un cambio radical en la disminución de la pérdida del color y que a 7.5 ml de Catalasa agregada tenemos 0 % de color perdido. El tiempo de reacción no parece ser un factor determinante en el inicio de la actividad de la enzima Catalasa, ya que como se puede apreciar en la tabla 5, la enzima que degrada el color actúa desde el momento en que comienza la hidrólisis del bagazo del betabel, por la enzima Celulasa, y sin embargo, a los 10 minutos de hidrólisis y con 7.5 ml de enzima Catalasa, se logra inhibir el efecto de degradación del color. Algo similar a lo mostrado en la tabla 5, se puede apreciar en la tabla 6, en donde la única diferencia es el tiempo de hidrólisis, el cual es en este último

experimento 15 minutos. Aquí podemos observar que después de agregar 3 ml de enzima Catalasa no hay un cambio notable en la disminución de la pérdida del color pero a 7.5 ml de Catalasa agregada nuevamente tenemos 0 % de color perdido, lo cual parece indicar una tendencia y también una concentración adecuada. En la tabla 7 el efecto de la enzima Catalasa sobre la peroxidasa se hace patente; se puede apreciar que la enzima peroxidasa queda completamente inhibida cuando se agregan 7.5 ml de enzima Catalasa es decir una relación 1:3 Celulasa-Catalasa, ya que la concentración de la enzima Celulasa en este experimento fue 2.5%. Se observa que no se pierde color cuando la enzima Celulasa esta en presencia de la enzima Catalasa, de otro modo, se pierde hasta un 50% del color inicialmente presente en la muestra. Con estos experimentos se pueden fundamentar respuestas a algunas de las preguntas planteadas acerca de la problemática en cuestión, como los son:

Parece que si es una enzima peroxidasa la que es la causa de la degradación del color en el bagazo del betabel, por otro lado la eliminación del peróxido de hidrogeno del sistema a causa de la Catalasa inhibe la acción catalítica de la peroxidasa. En la tabla 7, se puede encontrar la relación 1:3 Celulasa: Catalasa. Esta relación parece ser la adecuada para lograr inhibir el efecto de la peroxidasa. También se realizaron pruebas con la enzima Catalasa con relación 1:4 y 1:6 (datos no mostrados), encontrándose que un exceso de concentración de la enzima Catalasa no provoca ninguna inhibición de la peroxidasa, sino que ésta enzima, la Catalasa, no actúa en lo absoluto cuando se maneja una relación distinta a 1:3, Celulasa-Catalasa; es claro según estos resultados, que es esta la relación adecuada. Cabe resaltar que aunque se manejaron diferentes tiempos de hidrólisis, este no influyó en nada sobre la degradación de la betalainas, cuando la enzima Celulasa estaba presente; se observa que cuando se agrega 7.5 ml de Catalasa es cuando se logra inhibir el efecto de la peroxidasa y no cuando el tiempo de reacción es mayor o menor durante la hidrólisis. La concentración de la enzima Celulasa fue 2.5% p/v; el volumen de enzima Celulasa correspondiente a esta concentración fue 2.5 ml y es por eso que se adicionaron 7.5 ml de enzima Catalasa diluida 100,000 veces. Los experimentos hasta este punto realizados, muestran que la Catalasa inhibe a la enzima peroxidasa que degrada a las betalainas, sin embargo, los experimentos también muestran que no es posible extraer color del bagazo del betabel usando esta enzima, ya que el punto óptimo es cuando no se pierde color, es decir se tiene 0% de color perdido, lo cual también significa 0% de color recuperado. La aplicación de la enzima Celulasa en la investigación, provoca mas desventajas que ventajas y los

resultados hasta ahora encontrados no justifican su utilización. En este punto del trabajo, se decide excluir a la enzima Celulasa para los fines que esta investigación pretende (ver objetivos).

Determinación de la concentración óptima de las enzimas comerciales

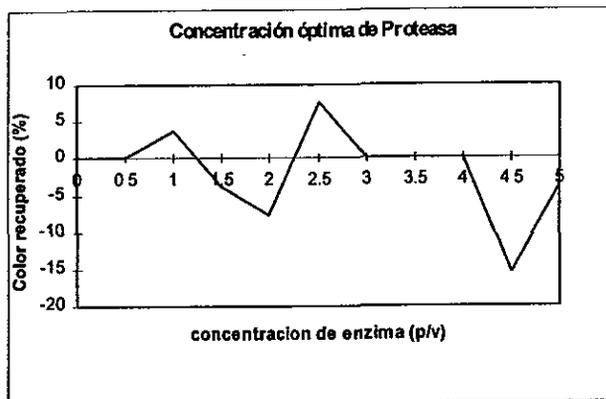


Fig. 18. Determinación de la concentración óptima de la enzima Proteasa.

Los experimentos para determinar la concentración óptima de la enzima Proteasa, se muestran en la figura 18. Se observa que la concentración adecuada para efectuar la extracción es 2.5% p/v. Cuando se alcanza esta concentración, se extrae 8% de color, sin embargo no hay consistencia en los resultados ni antes ni después de esta concentración. Cuando se maneja una concentración de 1% p/v, también se obtienen resultados positivos, pero no tan efectivos como cuando se maneja una Concentración de 2.5% p/v. No está bien definido que es lo que sucede cuando se manejan concentraciones superiores a 2.5% p/v, se puede suponer que la enzima Proteasa al ser agregada en concentraciones superiores a 2.5% p/v se inhibe dentro del sistema y no puede actuar, sin embargo este comportamiento no está del todo explicado, aunque parece una explicación probable. Otra posibilidad que se plantea, es la presencia de la enzima peroxidasa, que causaría los mismos problemas ocasionados cuando se utilizó la enzima Celulasa.

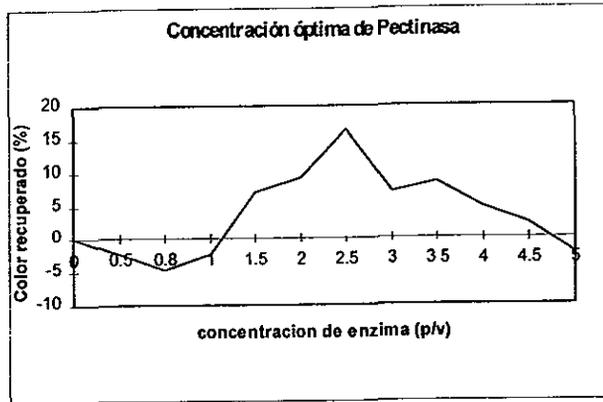


Fig. 19. Determinación de la Concentración óptima de la enzima Pectinasa.

La figura 19, muestra que la concentración de enzima Pectinasa donde se obtienen los resultados positivos en la recuperación del color presente en el bagazo del betabel es 2.5% p/v. Después de una concentración de 1% p/v se observa un aumento en el contenido de color de las muestras; esta concentración llega a su punto óptimo cuando alcanza el valor de 2.5% p/v después de esta, el contenido de color recuperado cae hasta cero. Lo anterior se puede deber a que a altas concentraciones de enzima, se inhibe la actividad de esta, y no se puede recuperar color más que a aquel que se obtuvo en el punto óptimo. Hasta este punto del trabajo se pueden rescatar los siguientes puntos:

La temperatura adecuada de las enzimas Proteasa y Pectinasa es 30° centígrados, el pH donde mejor actúan ambas enzimas es también el mismo para ambas y es pH:5. La concentración mas adecuada para la enzima Pectinasa es 2.5% p/v y para la enzima Proteasa podría ser también 2.5% p/v aunque esto no se mostró del todo claro. Se utilizó la enzima Catalasa, para inhibir una enzima o sistema enzimático, que degrada a las betalainas, liberado posiblemente cuando se rompe la pared celular de las células vegetativas presentes en el bagazo del betabel, sin embargo este sistema enzimático oxidativo, podría ser liberado por la presencia de las enzimas Proteasa y Pectinasa. Se propone efectuar un experimento en donde estén presentes las dos enzimas antes mencionadas en presencia y ausencia de la enzima Catalasa para comprobar si el sistema degradativo de la betalainas es o no

liberado durante la acción de estas. Los sistemas contenían un volumen de enzima de 2.5 ml, correspondiente a una concentración de 2.5% p/v; como consecuencia de esto, se adicionó un volumen de 7.5 ml de enzima Catalasa (relación 1:3), y se observó el efecto de las enzimas Proteasa y Pectinasa en presencia de la enzima Catalasa

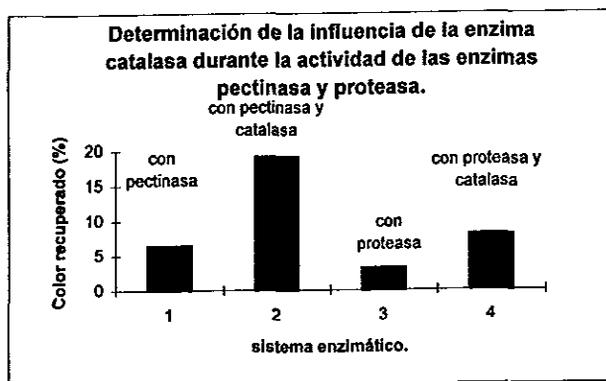


Fig. 20. Determinación de la influencia de la enzima Catalasa durante la extracción enzimática.

La figura 20 muestra que la influencia de la enzima Catalasa durante la extracción enzimática, efectivamente se hace patente, ya que se obtienen mejores resultados cuando la enzima Catalasa esta presente que en su defecto; Se puede decir que la enzima peroxidasa si es liberada por la acción de las Pectinasas y de las Proteasas, sin embargo, no en la proporción que la hacia la enzima Celulasa. De cualquier modo, este experimento permite fundamentar el uso de la enzima Catalasa durante el resto de la investigación. La figura 20 permite suponer que la enzima que degrada a las betalainas esta presente desde el inicio de la hidrólisis enzimática, solo que a bajas concentraciones de enzima, el efecto de la degradación no se observa, en cambio si se observa recuperación del color (Fig. 19) hasta que la concentración de enzimas es superior a 2.5%, después de este punto la degradación de las betalainas es la que prevalece.

Determinación del sistema enzimático óptimo.

Para establecer el diseño del sistema enzimático, se utilizó la información hasta el momento recopilada durante este trabajo. Esta información es la siguiente:

El pH en el cual se trabajará es pH: 5.00, temperatura 30° centígrados, las concentraciones de las enzimas 2.5%p/v, sin embargo se propone utilizar un diseño modificando estas ya que si las enzimas pueden actuar correctamente sin inhibirse dentro del sistema, se podrían mejorar resultados al variar sus concentraciones. Concentración del bagazo en el sistema es: 0.05 g/ml. Todos los volúmenes manejados son iguales a 10 ml. Los tiempos que se manejaron durante la hidrólisis enzimática fueron: 15, 20, 30 y 45 minutos, por considerarse los tiempos adecuados para observar el comportamiento enzimático durante su actividad dentro del sistema propuesto. Todos los experimentos se realizaron por duplicado, los resultados mostrados, son el promedio de dos determinaciones. Se propone manejar los dos sistemas que a continuación se especifican en la tabla 8.

Tabla 8.

<i>SISTEMA ENZIMÁTICO</i>	<i>CONCENTRACIÓN DE ENZIMAS (g/100 ml)</i>	
	<i>PROTEASA</i>	<i>PECTINASA</i>
I	1.25 2.5 3.75	2.5
II	2.5	1.25 2.5 3.75

Por otro lado se propone a agregar la enzima Catalasa en un volumen de 7.5 ml para cada sistema; 7.5 ml corresponde a tres veces el volumen de la enzima principal (Proteasa o Pectinasa

dependiendo el sistema) que se maneja, pero se debe recordar que la enzima Catalasa fue diluida antes de su adición al sistema seleccionado. Los resultados obtenidos al evaluar los sistemas anteriormente citados, se compararon contra modelos que fueron sometidos exactamente a las mismas condiciones, excepto que estos últimos no contenían ninguna enzima. Los resultados obtenidos al llevar a cabo el sistema I se muestran a continuación:

Condición 15 minutos de hidrólisis.

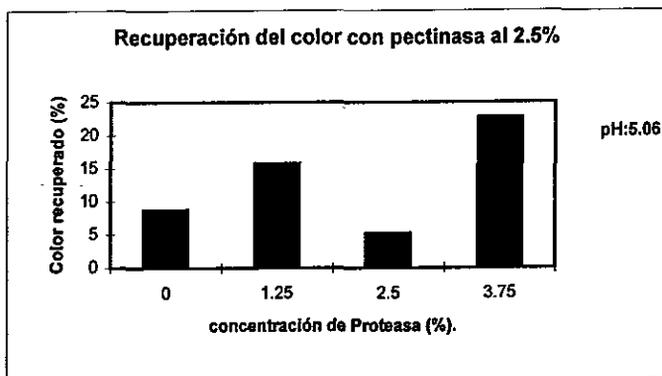


Fig.21. Contenido de color recuperado utilizando mezcla de enzimas (Sistema I).

Como se puede apreciar en la figura 21 los rendimientos son diferentes y parecen aumentar conforme la concentración de Proteasa aumenta, excepto cuando la concentración de ambas enzimas es igual, es decir 2.5% p/v. Los mejores rendimientos equivalen a 22.8% cuando la concentración de Proteasa es 3.75 %; el rendimiento no es muy alto (22.8%) sin embargo en este caso solo se efectuaron 15 minutos de hidrólisis y esta puede ser la explicación del bajo rendimiento obtenido. En el experimento de la figura 21, las muestras contenían la concentración de enzima citada en la tabla 8, los valores de color recuperado, fueron obtenidos calculando la diferencia de color que existía entre los sistemas con enzimas y muestras que fueron sometidas a las mismas condiciones pero sin mezcla enzimática.

Condición: 20 minutos de hidrólisis

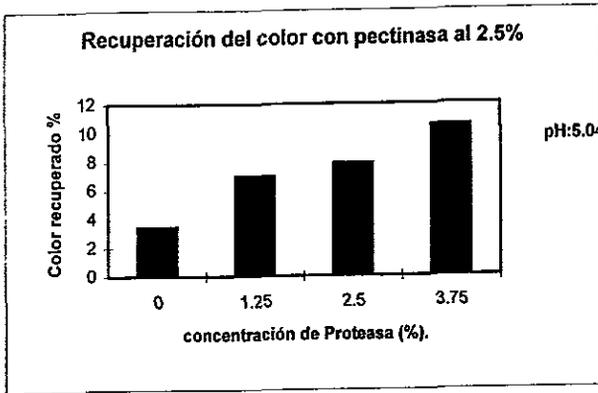


Fig. 22. Contenido de Color recuperado utilizando mezcla de enzimas (Sistema I).

Con 20 minutos de hidrólisis enzimática se tienen resultados que plantean la posibilidad de un aumento del color conforme aumenta la concentración de enzima Proteasa, cuando previamente se ha fijado la concentración de Pectinasa en 2.5%, esto se observa en la figura 22; aunque no hay altos rendimientos, si se observa la influencia de la enzima Proteasa cuando aumenta su concentración; parece claro que 20 minutos no son suficientes para lograr buenos rendimientos en la extracción.

Por otro lado, en la figura 23, se observa nuevamente que cuando la concentración de la enzima Proteasa alcanza el valor de 3.75% p/v, se obtienen los mejores resultados en cuanto al contenido de color recuperado. Después de 30 minutos de hidrólisis enzimática, podemos observar que no se aprecia ningún tipo de inhibición por parte de alguna de las enzimas utilizadas, (Proteasa o Pectinasas) una con respecto a la otra. . Esto era de esperarse, ya que las enzimas tienen diferentes sustratos, con lo que en un inicio pueden actuar sin que se presente la inhibición.

Condición: 30 minutos de hidrólisis.

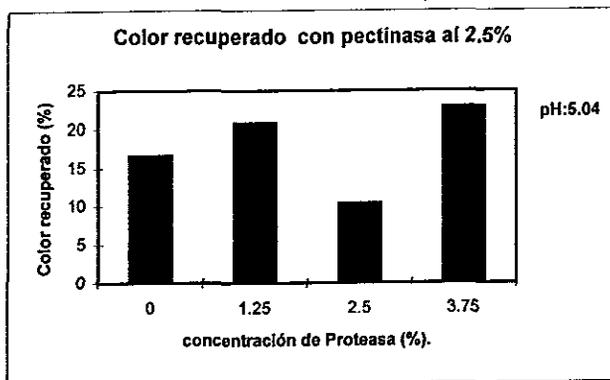


Fig. 23. Contenido de Color recuperado utilizando mezcla de enzimas (Sistema I).

Parece que los productos de hidrólisis, después de 30 minutos, tampoco contribuyen a establecer algún tipo de impedimento, que pudiera suponer la disminución en la actividad enzimática.

Condición: 45 minutos de hidrólisis.

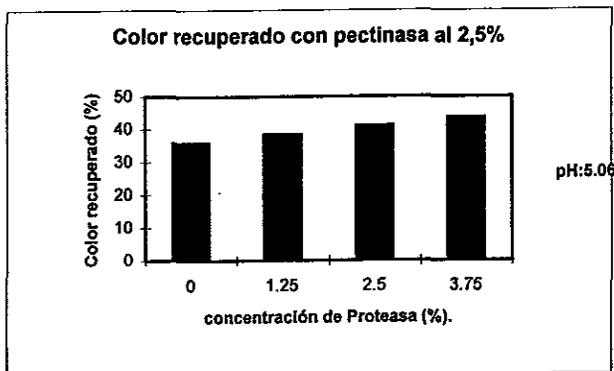


Fig. 24. Contenido de Color recuperado utilizando mezcla de enzimas (Sistema I).

La figura 24, se obtuvo después de llevar a cabo la hidrólisis durante 45 minutos; en esta figura se observan los mejores rendimientos en cuanto a contenido de color recuperado, hasta el momento obtenidos. Después de 45 minutos, se obtuvo 43.58% de color el cual significa el valor más alto encontrado hasta el momento. Parece que cuando la concentración de la enzima Proteasa alcanza el valor de 3.75% p/v y se mantiene la enzima Pectinasa en 2.5%, en el sistema se obtienen los mejores rendimientos. En general se mejoraron todos los rendimientos, en las diferentes concentraciones de enzima Proteasa utilizada, con respecto a tiempos de hidrólisis menores, lo cual indica que el tiempo es un factor importante durante la misma y en la medida de que este aumenta el contenido de color recuperado también se incrementa. Cuando se manejó 1.25% de Proteasa se obtuvo: 38.46% de recuperación de color, y cuando se manejo 2.5% p/v se obtuvo un 41% de color recuperado.

Los resultados obtenidos al efectuar el sistema II, se muestran a continuación:

Condición: 15 minutos de hidrólisis.

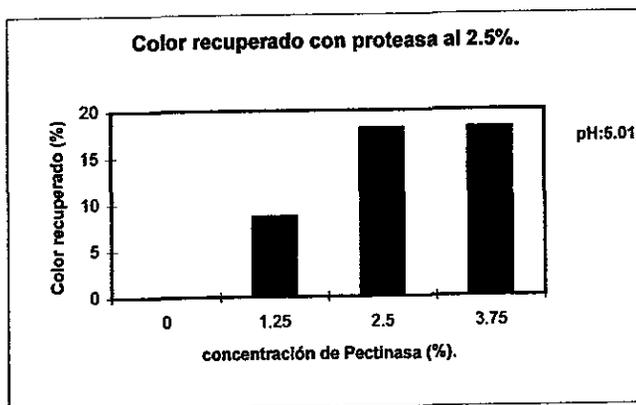
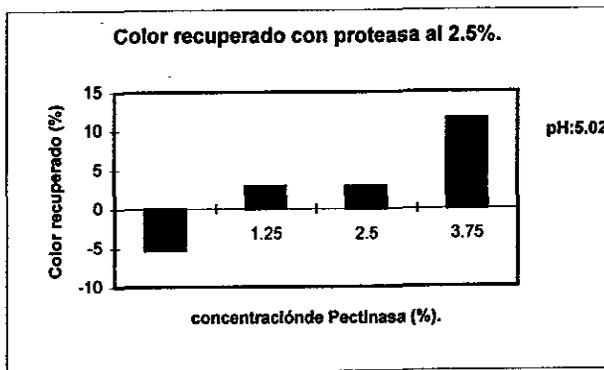


Fig. 25. Contenido de Color recuperado utilizando mezcla de enzimas (Sistema II).

La figura 25 confirma que el uso de un sistema enzimático para este caso en particular, tienen una tendencia positiva, ya que como se observa, tanto a 2.5% como a 3.75 % de enzima Pectinasa se obtiene un rendimiento de 18% de color recuperado, esto a los 15 minutos de hidrólisis. Cuando se manejó 0% de Pectinasa, no se recupero color alguno, sin embargo los resultados antes mostrados utilizando la enzima Proteasa en concentración de 2.5 p/v, indican que con esta concentración sí se puede extraer color, no así en este experimento en el que posiblemente la actividad de la enzima Proteasa fue inhibida por un factor que no es posible especificar.

Condición: 20 minutos de hidrólisis.



ESTA TAPA NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Fig. 26. Contenido de Color recuperado utilizando mezcla de enzimas (Sistema II).

La figura 26 muestra que conforme aumenta la concentración de enzima Pectinasa se obtiene un mayor contenido de color; como anteriormente se había observado; cuando la concentración de enzima Pectinasa alcanza su valor mas alto, se obtienen los mejores rendimientos. Un resultado poco común se presentó cuando se manejó la enzima Proteasa sola, ya que en este caso no se obtiene color sino que se pierde 5% de color, sin embargo la causa de este comportamiento no esta del todo esclarecida ya que en el experimento mostrado en la figura 24, no se pudo recuperar color cuando se manejó la enzima Proteasa aislada, manteniendo la hidrólisis por 15 minutos y con 5 minutos mas de hidrólisis (figura 26) se perdió el 5% del color presente en la muestra.

Condición: 30 minutos de hidrólisis.

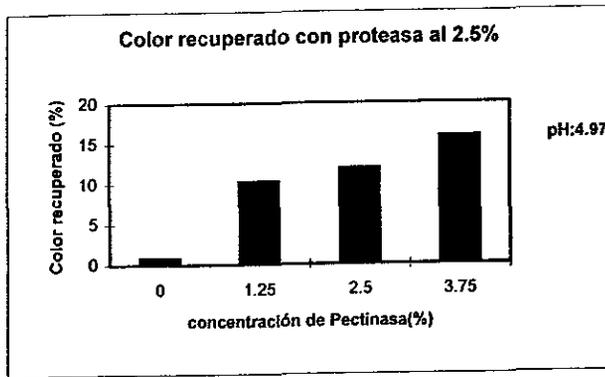


Fig. 27. Contenido de Color recuperado utilizando mezcla de enzimas (Sistema II).

Con 0% de enzima Pectinasa en este experimento mostrado en la figura 27, solo se obtiene 0.8% de color recuperado. Cuando la concentración de Pectinasa sube a 1.25%, se recupera 10.3% de color. El contenido de color recuperado aumenta hasta 11.9% cuando se maneja 2.5% de Pectinasa y sube hasta 15.87% cuando se usa una concentración de 3.75% de esta enzima. Esto indica que cuando aumentamos la concentración de Pectinasa aumenta la recuperación del color contenido en el bagazo de betabel; notamos que con 20 y 30 minutos de hidrólisis, no hay mucha diferencia en cuanto al contenido de color recuperado; lo anterior puede deberse a que la enzima Proteasa agregada desde un inicio a una concentración igual a 2.5% p/v esta dictando el curso de la extracción, siendo esta no muy efectiva

Condición: 45 minutos de hidrólisis.

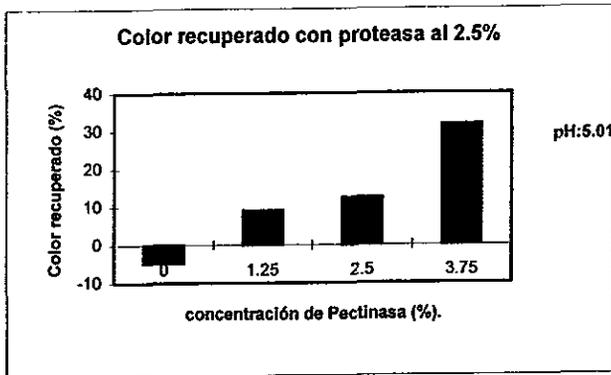


Fig. 28. Contenido de Color recuperado utilizando mezcla de enzimas (Sistema II).

En la figura 28 se observa la misma tendencia encontrada con anterioridad; conforme aumenta la concentración de Pectinasa aumenta el contenido de color recuperado, obteniéndose un óptimo cuando la concentración de enzima Pectinasa es precisamente 3.75 p/v. El mejor rendimiento se obtuvo cuando se manejó 3.75% de enzima Pectinasa; en este punto se recuperó un 32 % de color. Los resultados encontrados parecen indicar una acción sinérgica entre ambas enzimas, sin embargo, cuando la concentración de la enzima Proteasa es 3.75% y la de la Pectinasa es 2.5%, se obtienen mejores resultados que cuando se manejan las concentraciones inversas. Esto supone que la actividad sinérgica está dictada por la enzima Proteasa cuando esta se adiciona en una concentración de 3.75%. La acción de la enzima Pectinasa dentro del sistema enzimático parece ser adecuada para lograr los objetivos de este trabajo. Al parecer cuando la enzima Proteasa está en concentración de 3.75 % y la enzima Pectinasa a 2.5 %, ambas enzimas actúan de modo tal que se puede establecer un sistema óptimo, y por otra parte cuando se maneja el sistema II, podemos decirse que los productos de la hidrólisis de las enzimas bajo estas condiciones, provoca que la extracción de las betalainas no sea del todo exitosa.

Hasta este punto de la investigación solo se han manejado volúmenes pequeños equivalentes a 10 ml. Con el objeto de realizar un escalamiento, para observar los resultados al ampliar el volumen de reacción en el sistema óptimo, se propone procesar un peso equivalente a 100 gramos de betabel y a partir de este dato efectuar el experimento con las condiciones que asemejen al sistema óptimo encontrado durante este trabajo. Todos los valores correspondientes al contenido de color recuperado, se obtuvieron con respecto un sistema con las mismas características que el sistema enzimático óptimo, excepto que en los primeros no se adicionó ninguna enzima. También se propone aumentar el tiempo de hidrólisis del sistema, ya que el tiempo de 45 minutos es pequeño para el escalamiento que se pretende efectuar.

El sistema tendrá las siguientes especificaciones:

- Betabel: 100 gramos.
- Volumen final: x gramos de bagazo de betabel obtenido multiplicado por 20, que equivale al inverso de 0.05 g/ml, que es la concentración de sustrato; el resultado es el volumen final en ml que se manejó.
- pH: 5.00.

Concentración de enzimas:

- Pectinasa 2.5% p/v.
- Proteasa 3.75% p/v.
- Temperatura: 30° centígrados.

En cuanto al tiempo de hidrólisis se propuso manejar los siguientes tiempos:

- 45 minutos (tiempo óptimo encontrado durante las pruebas anteriores).
- 68 minutos (equivalente a 50% mas tiempo que el óptimo encontrado durante las pruebas anteriores).
- 90 minutos (equivalente a 100% mas tiempo que el óptimo encontrado durante pruebas anteriores).

Los resultados obtenidos mediante la modelo descrito anteriormente, se muestran a continuación:

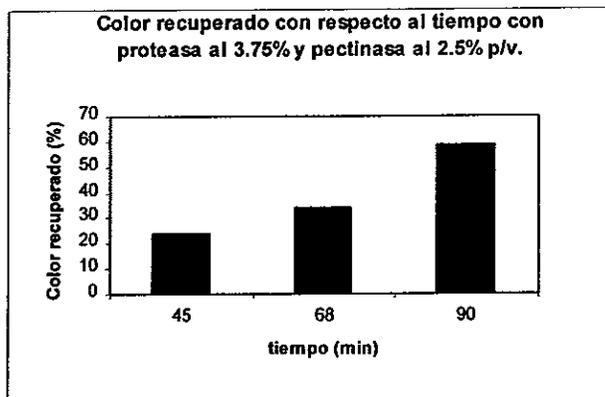


Fig. 29. Contenido de Color recuperado mediante un escalamiento.

La figura 29 muestra los resultados obtenidos mediante el escalamiento del sistema óptimo utilizando mezcla de enzimas y tres diferentes tiempos de hidrólisis. Como se puede apreciar claramente el mejor tiempo de reacción fue 90 minutos, después de los cuales se obtuvo, 58.47% de color recuperado; este fue el valor más alto obtenido en todo el proyecto y se puede atribuir a que en el escalamiento se puede manipular más fácilmente el material y equipo donde se efectuó la reacción. El experimento confirmó que al ampliar las cantidades manejadas durante el escalamiento se obtuvieron mejores resultados, que los obtenidos en las pruebas preliminares, en donde los volúmenes utilizados fueron de 10ml. La misma causa puede atribuirse al rendimiento encontrado a 45 minutos, cuando solo se obtuvo 23.82% de color recuperado comparado con el 43.58% encontrado durante la determinación mostrada en la figura 24; se debe recordar que el experimento de la figura 24, se efectuó con un volumen final de 10 ml comparado con el volumen del escalamiento que fue para el caso de 45 minutos de hidrólisis, 501.5 ml. En la figura 29 se observa que a los 45 minutos de hidrólisis se recuperó 23.83% de color y en la figura 24 en donde se muestran los resultados de este mismo experimento solo que con un volumen final de 10 ml, se recupero un 43.55%; lo anterior podemos atribuirlo a que el aumento del volumen influyó en los rendimientos obtenidos, ya que aunque es más fácil manipular el sistema escalado, las enzimas

necesitaron más tiempo para actuar sobre su sustrato específico y como consecuencia de esto, el rendimiento disminuyó, a los 45 minutos de hidrólisis. Algo similar se presentó a los 68 minutos de hidrólisis, que aunque para este tiempo no hay un experimento con el cual podamos compararlo, los rendimientos encontrados son menores que los obtenidos y mostrados en la figura 24; lo anterior lo atribuimos a las causas ya antes mencionadas.

Por otro lado, se puede determinar el contenido de color en forma de betanina, pigmento principal de las betalainas, a través de la siguiente fórmula:

$$\text{g de betanina/100 g de betabel} = \frac{\text{Absorbancia a } 535\text{nm} \times 100}{\% E \times b \times []}$$

en donde:

- %E = coeficiente de extinción molar=112
- b = diámetro de la celda.
- []=concentración de la muestra en g/l.

La fórmula anterior, permite conocer el contenido total de color expresado en g de colorante por 100 gramos de producto, dentro del betabel entero, el cual incluye el contenido de betanina extraído por el sistema enzimático óptimo (Sistema I).

El procedimiento seguido para determinar el contenido de betanina de las muestras es el siguiente: Se pesan 0.25g de jugo de betabel y se disuelven con 100 ml de agua destilada; se filtra a través de papel filtro del N°1 y se afora a 250 ml. con agua destilada. Los resultados obtenidos del experimento anterior, se muestran en la tabla número 9.

Tabla 9.

Contenido de betanina en jugo de betabel	Contenido de betanina extraído con el sistema I	Contenido de betanina total.
0.324	0.087	0.411

Podemos observar en estos resultados, que el contenido de betanina en el bagazo de betabel fue 0.087 g de betanina/ 100 gramos de muestra; este valor representa el 26.87 % del contenido total de betanina presente en el jugo del betabel, el cual es el único que se procesa comúnmente para obtener colorante de la leguminosa en cuestión, en la industria de los alimentos; esto significa que un contenido de betanina de 27 % no se aprovecha sino todo lo contrario, se elimina por considerarse que en el bagazo de betabel no existe suficiente color, como para ser procesado.

**“No se puede decir de una cosa
lo que realmente es, sino únicamente
expresar la impresión que causa
a nuestros sentidos”**

Protágoras.

CONCLUSIONES.

6.-CONCLUSIONES

- La aplicación de la enzima Celulasa dentro del experimento no fue recomendable, debido a que presentó diversas desventajas que provocaron su exclusión.
- La acción de la enzima Celulasa sobre el bagazo de betabel, provocó la liberación de una enzima con carácter de peroxidasa presente *per se* en el betabel; los efectos negativos de esta, sobre las betalainas, fueron minimizados mediante la acción de la enzima Catalasa.
- La presencia de la enzima Catalasa en el sistema enzimático propuesto, permite la adecuada extracción del color contenido dentro del bagazo, ya que inhibe a la enzima peroxidasa presente *per se* en el betabel.
- El sistema enzimático que contiene la enzima Pectinasa en concentración 2.5% p/v y la enzima Proteasa en concentración 3.75%p/v, es el sistema que presenta la mejor opción para efectuar la extracción del color presente en el bagazo de betabel.
- El escalamiento realizado, demuestra que es posible obtener rendimientos mayores al 43.58 % cuando se amplían los volúmenes de reacción.

7.-ANEXO

SOLUCIONES.

-Soluciones para determinar proteína por el método de Biuret.

Reactivo de Biuret.

Pesar y disolver 0.75 gramos de $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y 3 g ramos de Tartrato doble de Sodio y Potasio; agregar 150 ml de NaOH al 10% libre de carbonatos; *aforar a 500 ml con agua destilada. Guardar en recipiente de poliestireno.

*La solución de NaOH al 10 % libre de carbonatos se prepara con agua destilada previamente hervida 30 minutos y se utiliza después de haberse enfriado.

-Soluciones para determinar actividad específica.

Reactivo DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico). Pesar y disolver 1g de ácido 3,5-dinitrosalicílico, agregar 20 ml de solución de NaOH 2N; una vez que se ha disuelto todo el material, se agrega y se disuelven 30 gramos de tartrato doble de sodio y potasio y se aforó a 100 ml. Se almacena esta solución en un frasco color ámbar.

-Soluciones para determinar fibra cruda

- Acido sulfúrico al 1.25%: Se miden con pipeta graduada, 1.25 ml de ácido sulfúrico concentrado y se aforan con agua destilada a 100ml.
- Hidróxido de sodio al 1.25%: -Se pesan 1.25 gramos de hidróxido de sodio grado comercial y se disuelven con la cantidad de agua destilada necesaria; se aforó a 100ml.
- Solución amortiguadora de acetatos: -Se pesan 8.3 gramos de $\text{NaCOOCH}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y se disuelven con agua destilada, se agregan 3ml de ácido acético glacial, se ajusta el pH a 5.00 con ácido acético y se aforó a 1L.
- Solución amortiguadora de fosfatos: Se pesan 17 gramos de K_2HPO_4 , 11 gramos de KH_2PO_4 y se disuelven con agua destilada, se ajusta el pH a 7.00 con ácido clorhídrico y se aforó a 1L.

EQUIPO.

- Extractor de jugos “Philips” modelo HL-3161 SERIE 202.
- Espectrofotometro “Perkin-Elmer Lambda 2”.
- Estufa de secado “Ohaus” modelo MB 200.
- Espectrofotometro “Spectronic 20” modelo 3022.
- Incubadora “General Electric” modelo 122.

8.-BIBLIOGRAFÍA.

1. Attoe,L.E. (1982).”Degradation kinetics of betanine in solutions as influenced by oxigen”J.Agric. Food Chem.30.708.
2. Bevernfeind,J.C.(1981)”Carotenoids as colorants and vitamin a precursor”Academic-Press.Londres.Inglaterra.
3. Bilyk.A.(1982)”Reversibility of thermal degradation of betacyanines under the influence of isoascorbic acid”J.Agric.Food Chem.30.906.
4. Cerezal,P.(1994).”Estudio de la estabilidad del colorante de la remolacha(Beta vulgaris L.)en forma de licor concentrado”Tecn. Alim. 29 (3,4).
5. Faigh,G.J. (1995)”Enzyme formulations for optimizing juice yields”F.Tech.49 (9) 79.
6. Fennema,O.”Food Chemistry”.edt.Mercel Dekker,Inc.New york.E.U.A.1985.
7. Fox,P.F.”Food Enzymology”edit.Elsevier Applied Science.London.England.1991.
8. Gerhartz.W.”Enymes in industry”2da.edi.Alan Wiseman.New York.E.U.A.1990.
9. Hayward,P.M. (1992).”colorantes”Tecn.Alim.27 (4,5,6) 34.
10. Huang,A.S. (1987)”Effect of pH on the degradation and regeneration of betanine”J.Food.Sci.52.(6).1689.
11. Kearsley,W.M.”Stability and use of natural colours in foods red beet powder,copper chlorophyll and cochineal”J.Food.Tech.15.501.1980.
12. Lee,Y.N. (1981).”Betaine yield from a continuous solid-liquid extracion systems as influenced by raw product,post-harvest and processing variables.”J.Food.Sci.46.421.
13. López,T.M.(1992)”Estabilización de las betacianinas de la Opuntia Robusta y Opuntia Streptacantha”Tec.Alim.27 (4) 44.
14. Marmion,D.M.”Handbook of colorants for food,drug and cosmetics”edt.John Wiley y Sons.New York.E.U.A.1990.
15. Nagodawithana.T.”Enzymes in food processing”.Academic Press.3ra edi.San Diego,Cal.E.U.A.1996.
16. Official Methods of Analysisi of the Association of official Analytical Chemists. (AOAC) 14ed.Washington,E.U.A.1984.

17. Pash, J.H. (1975). "Betanine stability in buffer solutions containing organic acids, metals cations, antioxidants or sequestrants" *J. Food. Sci.* 40 (69) 1145.
18. Pennet, S.C. (1991) "New applications of industrial food enzymology: Economics and processes" *Food Technol.* 49 (9) 79
19. Pine, H.S. "Química Organica" ed. M. Graw-Hill. 2da edic. México. 1988.
20. Quintero, R.R. "Biotecnología alimentaria" ed. Limusa, México. 1ra edic. 1993.
21. Reed, G. "Enzymes in Food Processing" 3ra. ed. Academic Press. San Diego, Cal. E.U.A. 1993.
22. Saguy, I. (1978) "Thermal kinetic degradation of betanine and betalamic acid" *J. Agric. Food Chem.* 26 (2) 360.
23. Saguy, I. (1979) "Thermostability of red beet pigments (betanine and vulgagaxanthin-1): Influence of pH and temperature" *J. Food. Sci.* 44. 1554
24. Southgate, D.A. "Determination of Food Carbohydrates" 2da. ed. Elsevier Applied Science. New York, E.U.A. 1991.
25. Tórriz, O.J. (1991) "De la vista nace" *Tec. Alim.* 23 (3) 54
26. Villegas, R.M. Tesis. "Estudio de los colorantes del betabel" U.N.A.M.. 1979.
27. Wasserman, P.B. (1984). "Solubilization Of red beet cell wall betanin decolorizing enzyme" *J. Food. Sci.* 49. 1075.
28. Wiseman, A. "Handbook of enzyme biotechnology" Ellis-Howrwood limited. 2da. ed. New York. E.U.A. 1985.