

(73)

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**Extracción, Estudio y Aplicación de Enzimas
Proteolíticas de Cnidocolus Chayamansa
(Chaya)**

T E S I S

Que para obtener el título de :

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

p r e s e n t a :

CLAUDIA MENDIZABAL ORIZA

México, D. F.

1980

M-21714



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 ORIGINALMENTE SEGUN EL TEMA:

PRESIDENTE: M. EN C. RUBEN GARCIA COSS.
VOCAL: DR. AGUSTIN LOPEZ MUNGÜIA CANALES.
SECRETARIO: M. EN C. EDUARDO BARZANA GARCIA.
1er. SUPLENTE: ING. QUIM. FIDEL FIGUEROA MARTINEZ.
2do. SUPLENTE: DR. SALVADOR BADUI DERGAL.

Sitio donde se desarrolló el tema:
INDUSTRIAL DE ALIMENTOS S. A.
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION.

Nombre completo y firma del sustentante:
CLAUDIA MENDIZABAL ORIZA

Claudia Mendizabal Oriza

Nombre completo y firma del asesor del tema:
M. EN C. EDUARDO BARZANA GARCIA.

Eduardo Barzana



DEPTO. DE PASANTES Y
EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

A MIS PADRES

Por su ejemplo
de trabajo y
dedicación

A MIS HERMANOS

Con cariño

Mi agradecimiento al
Ing. Quím. Felipe Suberbie M.
por el estímulo y
facilidades que me brindó para
la realización de este trabajo.

Mi agradecimiento a la
División de Estudios de
Posgrado. Departamento
de Alimentos por su o-
rientación y apoyo.

INDICE

	PAGINA
I INTRODUCCION	1
II GENERALIDADES	4
2.1. Generalidades sobre <u>Cnidocolus chayamansa</u> .	
2.1.1. Descripción botánica	6
2.1.2. Cultivo	7
2.1.3. Composición	9
2.1.4. Usos	13
2.2. Generalidades sobre Proteasas - Vegetales	15
2.2.1. Producción de enzimas proteolíticas vegetales	16
2.2.2. Preparación de enzimas comerciales	17
2.2.3. Estabilización de enzimas comerciales	21
2.2.4. Métodos de ensayo	22
2.2.5. Principales aplicaciones comerciales de las proteasas vegetales	23
2.2.6. Proteasas microbianas	28

	PAGINA
III MATERIALES Y METODOS	30
3.1. Análisis Bromatológico	31
3.2. Extracción de Enzimas Proteolíticas	31
3.2.1. Efecto del Proceso de Liofilización	32
3.2.2. Soluciones para la extracción	33
3.3. Determinación de Actividad Proteolítica	35
3.4. Determinaciones. Extractos Crudos Liofilizados	40
3.4.1. Actividad enzimática de los extractos crudos liofilizados	40
3.4.2. Efecto de la temperatura	41
3.4.3. Pruebas de termoestabilidad	42
3.4.4. Efecto del pH	43
3.4.5. Rendimiento de enzima extraída	44
IV RESULTADOS	45
V APLICACION DEL EXTRACTO CRUDO ENZIMATICO	54
VI CONCLUSIONES	69
VII BIBLIOGRAFIA	73

INTRODUCCION

La aplicación comercial de enzimas se inició a fines del siglo pasado con el descubrimiento de Jochiki Takamine de una enzima diastásica. Posteriormente en 1911 Wallerstein's patentó el uso de enzimas proteolíticas en la cerveza.

Actualmente se conocen más de 2 000 enzimas, de las cuales solo un pequeño número se utilizan en la industria alimentaria, incluyéndose dentro de este grupo a las proteasas de origen vegetal.

Es bien conocida la aplicación de la papaína, bromelina y ficina en procesos de alimentos, orientando su uso principalmente hacia la clarificación y estabilización de cerveza, ablandamiento de carnes y producción de hidrolizados de proteínas.

La importación de este tipo de proteasas se ha incrementado considerablemente en los últimos años y va aunada a la mayor demanda de la industria nacional, lo cual representa una importante fuga de divisas para el país.

Considerando que las proteasas vegetales provienen principalmente de árboles tropicales como la Carica papa-

ya, *Ananas comosus* y del género *Ficus*, es lógico pensar - que en la región del trópico húmedo del territorio mexicano, se desarrollen vegetales que presenten actividad proteolítica.

En el Sureste del país abarcando los estados de Yucatán, Tabasco y Quintana Roo, crece un arbusto de cuyas hojas se obtiene un extracto acuoso que produce una rápida precipitación de la leche, evidencia que hace pensar en la existencia de enzimas proteolíticas. Este vegetal es denominado comúnmente "chaya" (*Cnidocolus chayamansa*) y se caracteriza por ser una fuente extraordinaria de proteínas vegetales.

La Chaya es un arbusto que se desarrolla rápidamente y presenta un follaje abundante y resistente a las plagas; además no requiere de fertilizantes, ni abonos. La recolección de las hojas puede realizarse durante todo el año y el follaje se regenera en corto tiempo.

La papaína, que es la enzima proteolítica vegetal de mayor consumo desde el punto de vista comercial, presenta desventajas en cuanto a los costos que se derivan del cultivo del árbol, control de plagas y recolección del látex.

En virtud de las ventajas que presenta la chaya y de su disponibilidad como materia prima, se decidió enfocar el presente trabajo hacia la extracción óptima de proteasas y su aplicación en la industria alimentaria. El sub-

producto de la extracción puede ser utilizado como fuente de proteínas, lográndose así el aprovechamiento integral de la hoja.

GENERALIDADES

2.1. Generalidades sobre *Cnidoscolus chayamansa*

Chaya, *Cnidoscolus chayamansa* Mc Vaugh (1) es un vegetal que crece en las regiones del trópico húmedo caliente. Fue uno de los vegetales que formaron la dieta básica de los antiguos pobladores de la península de Yucatán, de donde se cree que es originaria. El nombre "chaya" proviene del maya "chay", siendo sus nombres vulgares chayacol, kikilchay, kekenchay y chaykeken. Se nombran a las especies domésticas como chayamansa y a las especies silvestres chaya brava para distinguirlas.

La descripción taxonómica fue dada por Bassey (2):

Reino	Vegetal
División	Tracheophyta
Subdivisión	Pteropsidae
Clase	Angiospermae
Subclase	Dicotyledoneae
Grupo	Archichlomydae
Orden	Geraniales
Familia	Euphorbiaceae

Género	<u>Cnidocolus</u>
Especie	<u>chayamansa o aconitifolius</u>
Nombre común	Chaya

El género Cnidocolus consiste de 40 a 50 especies - que se distinguen por una única envoltura floral blanca, glándulas peciolares distintivas y pelos epidérmicos urticantes. Se encuentra muy relacionada con C. aconitifolius I. M. Johnst, árbol grande, el cual se utiliza principalmente como ornamento y sus hojas también son comestibles.

La Chaya es un vegetal muy antiguo originario de la Península de Yucatán y probablemente fue llevada a otras regiones de México y Centroamérica, sin embargo en Guatemala, Honduras y Costa Rica, no se hace referencia a la Chaya como planta útil. La especie cercana C. aconitifolius se menciona frecuentemente como ornamental. La Chaya se introdujo a Cuba donde se le conoce por ser un vegetal comestible. De Cuba fue introducida a Florida como un arbusto exuberante poco apreciado. Aparentemente la primera introducción a Puerto Rico fue hecha por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos.

En Yucatán se le conoce como una planta maravillosa - tanto por sus propiedades alimenticias como medicinales, - siendo muy apreciada por los yucatecos. En el Sureste -- del país se le conoce como la carne vegetal y como la ---

planta de la vida por su gran capacidad de crecimiento - en tierra pobre y sin el menor cuidado. J

2.1.1. Descripción botánica

La Chaya es un arbusto alto de 2 a 3 metros de altura, presenta un follaje abundante. Su tallo central o tronco es de aproximadamente 10 cm de diámetro. Las ramas laterales tienen de 2 a 3 cm de diámetro cerca de -- las puntas. La corteza del tallo es suave, verde cuando es joven y grisácea cuando el arbusto es viejo.

La médula del tronco es larga, dividida en lamini-- llas blancas transversales y posee un látex blanco.

Las hojas son alternas, simples, lobuladas, denta-- das irregularmente, presentan un peciolo largo y contienen un jugo lechoso. En general son lisas presentando -- pequeños pelos en el contorno. Las hojas son más anchas que largas, alcanzando dimensiones de 22 X 18 cm, presen-- tan una superficie ondulada debido a la superposición de los lóbulos al presionar las hojas J (Fig. 1)

La Chaya florece rápidamente en cimas casi trihor-- quilladas, con las flores pistiladas en la horquilla ba-- sal. Son de color blanco y actinomorfas. Las flores -- masculinas tienen disco estaminoidal y los estambres li-- bres; las femeninas un disco anular, ovario tricarpelar, trilocular, con 3 estilos libres y con 2 óvulos en cada-- cavidad. El olor de la flor es desagradable.



FIG 1.

El fruto es una cápsula que no ha sido descrito taxonómicamente. Se desconoce el fruto maduro.

{Existen 3 especies de chayamansa o cultivadas y 2 especies silvestres.

Las especies cultivadas presentan una hoja más delgada, más pequeña, trilobular y con menos espinas que la chaya brava, los mayas la nombraban kekenchay o chaykeken --- (chaya-cerdo literalmente). Esta especie es la preferida por contener menos espinas y ser más fácil de cocer.

Las especies silvestres reciben el nombre de tzintzin chay, sus hojas son más alargadas, troncos y peciolo son más delgados y por la cantidad de espinas que presenta es menos consumida como alimento.)

2.1.2. Cultivo (5)

{ Se conoce muy poco sobre el cultivo de la Chaya. Crece en condiciones naturales silvestres y sin ningún cuidado. Puede ser plantada en cualquier época del año, pero es de más fácil propagación al comienzo de las estaciones lluviosas cuando los días son más largos.)

La producción de semillas es rara de ahí que la siembra y propagación más satisfactoria sea por medio de estacas. En presencia de luz y aire cualquier estaca produce raíces. La longitud de éstas puede variar desde 10 cm hasta 1 metro o más, pudiéndose colocar directamente en el -- suelo, el cual debe estar bien drenado y no muy húmedo al-

principio.

El suelo apropiado para la Chaya es la tierra roja o de moldeo aunque se ha visto que crece en la arena y arrecifes tolerando muchos otros tipos de suelo. Crece dentro de malezas o en campo abierto hasta 1 300 metros de altura sobre el nivel del mar.

Después de la plantación el crecimiento ocurre en 2- a 6 semanas. Las nuevas plantas crecen lentamente, siendo el crecimiento más rápido a los 4 meses de la plantación.

Al terminar el primer año de crecimiento las plantas pueden ser podadas considerablemente respondiendo con un nuevo crecimiento en forma rápida. Severas sequías pueden parar su crecimiento, llegándose a caer algunas hojas. A nivel casero se ha observado un crecimiento satisfactorio en condiciones adversas sin hacer uso de abonos o fertilizantes.)

La cosecha de la chaya no debe comenzar hasta que disponga de un follaje suficiente para permitir el despojo de algunas hojas sin impedir el crecimiento de la planta. La cantidad óptima de hojas que pueden ser removidas no ha sido determinado, pero plantas grandes aún cuando se cortan a 40 cm del suelo crecen rápidamente de nuevo. Una cosecha del 60 al 80% de las hojas y ramas no parecer excesiva y solo unas cuantas semanas son necesarias antes que una cosecha similar pueda repetirse.)

Pocas plagas se han observado. Existe un gusano del

cuerno del tomate que puede deshojarla completamente en pocos días, sin embargo la planta recupera rápidamente su follaje.

2.1.3. Composición

Para consumo alimenticio se utilizan las hojas y peciolo, a los cuales se les han hecho análisis bromatológicos, reportándose un alto contenido de proteínas, calcio, fierro y vitaminas. La composición de la Chaya es la siguiente:

COMPONENTES PRINCIPALES		CANTIDAD DE ACUERDO A		
		1)	2)	3)
H ₂ O	g	81.1	76.4	-
PROTEINAS	g	6.2	7.8	7.2
CARBOHIDRATOS	g	6.1	-	6.7
EXTRACTO ETereo	g	1.9	1.6	1.9
FIBRA CRUDA	g	2.6	2.3	-
CENIZAS	g	2.1	2.6	-
MINERALES				
CALCIO	mg	226	334	324
FIERRO	mg	5	11	8.62
FOSFORO	mg	54	82	-

VITAMINAS		1)	2)	3)
ACIDO ASCORBICO	mg	196	176	235
CAROTENO	mg	8	6	-
NIACINA	mg	1.5	0.2	1.6
RIBOFLAVINA	mg	0.4	0.5	0.35
TIAMINA	mg	0.3	0.2	0.24

Nota: Todos estos datos están dados por cada 100 gramos de hoja fresca.

1) Proporcionado por la League for International Food Education en 1973 (3).

2) Munsell et al (4).

3) Valor nutritivo de los alimentos mexicanos. Instituto Nacional de la Nutrición, México, 1974.

El Dr. Cravioto O. René y colaboradores (6) estudiaron la composición de 137 alimentos yucatecos de origen vegetal, entre los que figura la Chaya dentro de los más ricos en proteína, Ca y Fe.

Se ha encontrado que las cantidades proporcionadas por 100 g de la porción comestible de las hojas de Chaya, comparadas con las que recomienda ingerir diariamente el Consejo Nacional de Investigaciones de Estados Unidos, para un hombre moderadamente activo de 70 Kg son:

COMPONENTE		% DE LO RECOMENDADO
CALCIO	421 mg	53%

COMPONENTE		% DE LO RECOMENDADO
FIERRO	11.61 mg	116%
VITAMINA C	274.0 mg	365%
CAROTENO	5700 U.I. de Vit A	114%
RIBOFLAVINA	0.36 mg	18%

El contenido de aminoácidos de la proteína de la Chaya es el siguiente:

AMINOACIDOS	g a.a./ 100 g de proteína	
	(1)	(2)
		PATRON FAO 1957
ALANINA	4.6	-
ARGININA	11.2	-
ACIDO ASPARTICO	13.7	-
CISTEINA	1.7	2.0
ACIDO GLUTAMICO	19.0	-
GLICINA	3.5	-
ISOLEUCINA	3.1	4.2
LEUCINA	5.8	4.8
LISINA	4.9	4.2
METIONINA	1.2	2.2
FENIL ALANINA	6.0	2.8
PROLINA	1.0	-
SERINA	3.3	-
TREONINA	3.3	2.8

AMINOACIDOS	g a.a./ 100 g de proteína	
	(1)	(2)
		PATRON FAO 1957
TIROSINA	3.5	2.8
VALINA	4.9	4.2
TRIPTOFANO	-	1.4

Nota: (1) Análisis desarrollado por los laboratorios Nacionales de Fomento Industrial (3). El Triptofano no se determinó.

(2) Protein Requirements. Report of a Joint FAO/WHO Expert Group. World Health Organization Geneva 1965.

Por lo que se puede observar de los datos anteriores, la Chaya es una fuente de lisina y fuente moderada de aminoácidos sulfurados.

La Chaya contiene una gran cantidad de glucósidos cianogénicos, siendo su contenido mayor en las hojas y menor en los tallos. La naturaleza de estos compuestos no se ha establecido pero son solubles en agua e inestables.

Martin, Telek y Ruberté (7) encontraron que la Chaya contiene:

PROTEINAS	26.3 % B.S.
CAROTENO	4200 U.I. / 100 g
CONTENIDO DE ACIDO OXALICO	-

REACCION HCN
ALCALOIDES

ALTO CONTENIDO

2.1.4. Usos

Las hojas han sido utilizadas como alimento desde el tiempo de los antiguos mayas. En la "Relación de las Cosas de Yucatán" de Fray Diego de Landa, se nos hace referencia al respecto: "Hay otro género de árbol que indios y españoles llaman chayas que crecen tanto como higueras y lo parecen de alguna manera; las hojas de este árbol comen generalmente los indios y españoles de la misma suerte que coles y bereas aunque no son de tanto gusto".

En Yucatán constituye un plato regional, sabroso y barato y por esto es rara la casa de campesinos u obreros que no tenga matas de Chaya. En esta región del país se prepara una clase de tamal "el tzotobilchay", que es uno de los platillos más típicos y una forma básica nutritiva del pueblo maya ya que combina el maíz, la chaya y la pepita de calabaza llamada ziquil. José Díaz Bolio considera que ésta es la fórmula magistral de la nutriología maya.

En la preparación de la Chaya, las hojas y tallos se cortan en pequeñas porciones antes del cocimiento, luego se sumergen en agua y se dejan por espacio de 20 minutos a ebullición. Se sirven con mantequilla y aceite. Se cocinan las hojas como parte de guisados o fritas con otros

ingredientes como son carnes y vegetales.

La Chaya presenta un fuerte sabor comparado con otras hojas vegetales de los trópicos.

Para su uso posterior, puede conservarse congelada, - sin blanquearse. Se usa también como alimento para animales y como ornamento.

A nivel de la medicina popular se ha usado extensamente. Su uso como tal ha sido mencionado por José Díaz Boggio en relación a problemas de reducción de colesterol, arterioesclerosis, pelagra, hemorroides y acné. Se ha observado que actúa como laxante, diurético, estimulante de la circulación, para mejorar la digestión y estimula la lactación y endurecimiento de las uñas. Un aspecto negativo es que causa irritaciones de la piel por la presencia de pelos urticantes.

En la Universidad de Puerto Rico se ha empezado a dar importancia al estudio de la Chaya como una fuente rica en proteínas, para la obtención de concentrados proteícos.(7)

El procesamiento de hojas que crecen en los trópicos podría abrir una nueva industria y proporcionar parte de las proteínas que usualmente faltan en las regiones tropicales. Naggy Steven, Nordby and Telek han desarrollado un concentrado de proteína a partir de las hojas de Chaya.(8)

2.2. Generalidades sobre Proteasas Vegetales

Entre las enzimas proteolíticas, las proteasas vegetales se utilizan ampliamente en la industria de alimentos. La mayoría de estas enzimas se caracterizan por requerir de un grupo SH que es esencial para su actividad, de ahí que también se denominen enzimas tiólicas o sulfhidrúlicas.

Estas proteasas se han encontrado tanto en plantas dicotiledóneas (higo, papaya, euforbia), como en monocotiledóneas (piña y cereales). Existen dos grupos principales: las enzimas tiólicas, que presentan su actividad óptima a pH cercanos a 7 para la digestión de hemoglobina, caseína, albúmina de huevo y con fuerte actividad a la coagulación de la leche. El segundo grupo no requiere de grupos SH para su actividad, presentando un pH óptimo más alcalino y un poder coagulante de la leche menor. Estas enzimas son muy resistentes al calor, manteniendo a menudo su actividad a temperaturas de 60 a 70 °C.

De las enzimas más conocidas que se obtienen de frutos tropicales y se aplican en procesos de alimentos están la papaína, la ficina y las bromelinas provenientes del fruto y del tallo de la piña.

En comparación con la pepsina, tripsina o las proteasas bacterianas el costo de las proteasas vegetales restringe su aplicación a procesos donde se requiere una alta actividad y especificidad. Las proteasas vegetales rá

pidamente rompen ciertos enlaces peptídicos de las proteínas, lo cual hace que éstas sean útiles en procesos que requieren de una proteólisis limitada.

Se han aislado otras proteasas tiólicas de plantas tropicales como la calotropaina (9) de *Calotropis procera* o de *C. gigantea*, la mexicana de *Pileus mexicanus* - (10) (11), euforbaína de *Euphorbia grandiflora* o *Euphorbia lathyris*, la asclepaína de *Asclepias speciosa* (13), la pinguinaína de *Bromelia pinguin* (12) y la bolansaína de *Bromelia balansae*.

A continuación se presentan algunas proteasas vegetales y sus principales propiedades: (15) CUADRO . 1

2.2.1. Producción de enzimas proteolíticas vegetales

Para el manejo apropiado de las proteasas vegetales hay que tomar en cuenta ciertos factores como son: la estabilidad térmica, la naturaleza del sitio activo, la presencia de inhibidores, así como todas aquellas condiciones no favorables a la actividad enzimática.

En la industria de alimentos se utilizan preparaciones crudas o parcialmente refinadas que incluyen cantidades menores de otras enzimas. En la Tabla No. 2 se presentan las fuentes de proteasas comerciales crudas, indicando su composición y otros constituyentes enzimáticos presentes.

Tradicionalmente la papaína se obtiene de las plan

C U A D R O · 1

ENZIMA	Nombre común de la planta	Género y especie	Fuente del material	Estabilidad en ácidos o alcalis	Estabili - dad al calor	pH óptimo Digestión proteínas (c)	Actividad coagulante de la leche
PAPAINA (b)	Papaya	Carica papaya	Látex del fruto verde	Inestable abajo de pH 2.5 y arriba de 12	Tiempo de vida media de 56' a 75 °C	7-7.5	Fuerte
FICINA	Higo	Ficus carica, F. glabrata, F. doliaria	Látex	Estable a pH de 2		7	Fuerte
MEXICAINA (b)	Cuaguayote	Pileus mexicanus	Hojas y fruto	Estable a pH de 8			Fuerte
ASCLEPAINA (b)	Vencet6-sigo	Asclepias speciosa, A. mexicana A. syriaca	Látex, raíces	Inestable en medio ácido y básico	Asclepaína m. 78'60°C Asclepaína s. 13'60°C	7-7.5	Fuerte
BROMELINA (b)	Piña	Anana sativa	Fruto y hojas	Inestable. a pH de 2-3	21.5' a 60 °C	6-7	Fuerte
PINGUAINA (b)	Maya	Bromelia pinguin	Fruto			3 (leche)	Fuerte
EUFORBAINA (a)	Tártago	Euphorbia lathyris, E. cerifera	Látex			66	Fuerte

a) No tiólicas b) tiólicas c) caseína, ovoalbúmina, hemoglobina desnaturalizada

T A B L A 2

NOMBRE INDUSTRIAL	OTRAS PROTEASAS SULFHIDRILICAS	OTROS CONSTITUYENTES ENZIMATICOS
Papaína (cruda)	Papaína Quimopapaína A Quimopapaína B Carboxipeptidasa	Lisozima Citotransferasa Varias glucosidasas Celulasas
Bromelina	Varias bromelinas del tallo Carboxipeptidasas Glicin-esterasas	Celulasas Manosidásas Acido fosfatasas
Bromelina	Varias bromelinas del fruto	-
Ficina (cruda)	Varias ficinas	Lisozimas Peroxidasas Esterasa Acido fosfatasa Acetilglucosaminidasa

taciones de Carica papaya L. establecidas principalmente para la producción de papaína, mientras que la bromelina proveniente de los tallos de Ananas comosus es un subproducto de las plantaciones de piña establecidas para la producción del fruto.

Existen no más de 20 enzimas que actualmente tienen una comercialización a gran escala en la industria de alimentos. En el Gráfico 1 se presenta el número de enzimas conocidas de acuerdo a listas publicadas en función del tiempo en términos del año de la publicación, en comparación con el número de enzimas comerciales utilizadas en la industria de alimentos (20).

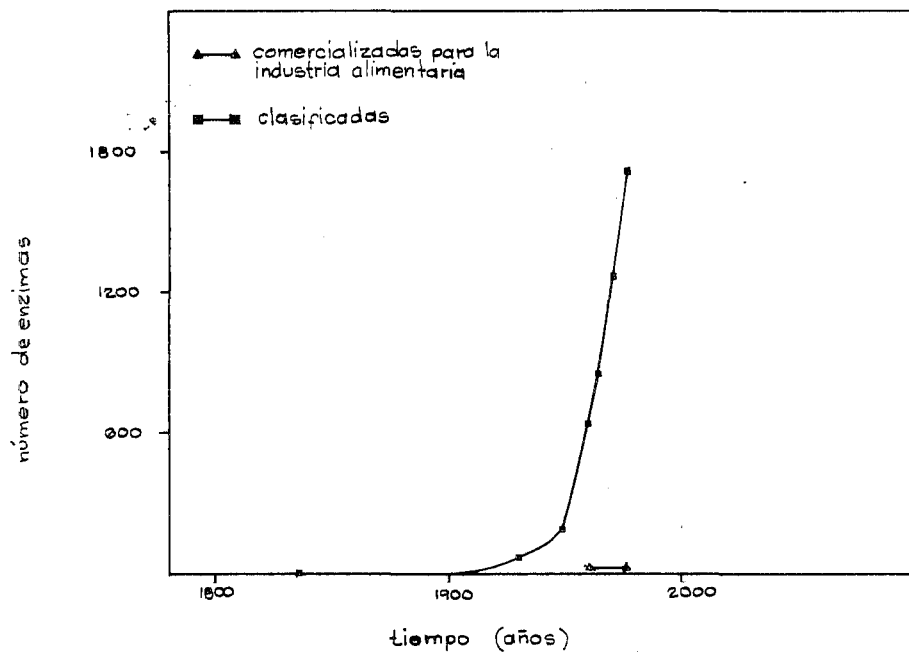
Dentro de las proteasas vegetales la papaína ocupa el primer lugar en cuanto a producción y uso. Los datos referentes a las importaciones de enzimas proteolíticas reflejan un constante aumento, con pequeñas fluctuaciones como se aprecia en la Tabla No 3.

2.2.2. Preparación de enzimas comerciales

A. Extracción:

Las enzimas provenientes de tejidos vegetales o animales o bien aquellas localizadas dentro de las células microbianas deben obtenerse en solución acuosa antes de su procesamiento. En general los tejidos secos son molidos a partículas muy pequeñas y los tejidos húmedos son desintegrados completamente por molienda u homogeneiza--

GRAF. No 1. NUMERO DE ENZIMAS CLASIFICADAS Y DE USO COMERCIAL EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA.



T A B L A 3

1976		1977		1978		1979	
Kg.	Pesos	Kg	Pesos	Kg	Pesos	Kg	Pesos
<u>PAPAINA</u>							
15 004	3 811 364	18 619	8 730 893	22 508	12 217 637	16 806	9 595 623
<u>BROMELINA</u>							
1 404	2 615 801	1 858	3 124 745	1 254	1 538 403	2 114	3 326 897
<u>PROTEASAS</u>							
3 196	716 368	5 287	3 480 399	3 086	929 470	6 403	1 495 487

1976-1977: Cifras del Anuario Estadístico del Comercio Exterior de los Estados Unidos Mexicanos correspondientes al año de que se trata, publicadas por la Secretaría de Programación y Presupuestos.

1978-1979: Subdirección de Investigación Económica del Banco de México S.A. - Primeras cifras preliminares para 1978-1979.

ción.

Estos materiales son extraídos con agua o con soluciones amortiguadoras adecuadas eliminando los restos insolubles por filtración o centrifugación.

Frecuentemente las soluciones acuosas están muy diluídas para una recuperación directa y se concentran por evaporación al vacío a temperaturas relativamente bajas.]

Una mayor concentración y separación de la mayor -- parte de impurezas solubles puede realizarse por precipi-- tación con solventes orgánicos, siendo los más utiliza-- dos el etanol, isopropanol o acetona. En ocasiones se - utilizan sales inorgánicas como $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Estas preci-- pitaciones se hacen a temperaturas bajas, en el menor -- tiempo posible para evitar la desnaturalización y pérdi-- da de actividad enzimática.

Frecuentemente las precipitaciones se llevan a cabo en presencia de materiales como azúcar, almidón o tierra de diatomeas para obtener un precipitado con caracterís-- ticas físicas deseables.

Al final la recuperación de la enzima puede reali-- zarse por filtración o centrifugación, pudiendo ser seca da al vacío.

En la actualidad se ha introducido el término de refinamiento de una enzima para indicar el proceso de disolución de los constituyentes solubles, incluyendo las enzimas del látex y luego precipitación de las enzimas con algún agente que no las inactive como los citados ante--

riormente.

Obtención y refinamiento de algunas proteasas
vegetales

Papaína.- Se obtiene del fruto de *Carica papaya* el cual crece en las regiones tropicales. La mayoría de la papaína cruda comercial se obtiene de Tanganika y de Ceilán. La proteasa se encuentra en el látex lechoso del fruto verde, de las hojas y del tronco del árbol. La obtención del látex se realiza mediante incisiones longitudinales en la parte más externa del fruto no maduro, que cuelga del árbol y que ha alcanzado su máximo tamaño. El látex es recolectado en recipientes. Estas incisiones se repiten cada 3 a 5 días mientras el fruto no llegue a madurar. Un árbol puede dar cerca de 450 g de látex seco por año. La coagulación del látex ocurre espontáneamente en 4 a 6 horas, acortándose el tiempo a 10' mediante agitación.

Secado del látex.- Puede hacerse al sol, o en secadores de corriente forzada a una temperatura entre 50 y 55 °C para llegar a un contenido de humedad del 5 al 8%. Se puede secar también al vacío lo cual disminuye cualquier oxidación. En la actualidad en los procesos de secado se busca un ahorro de energía, para lo cual se ha utilizado el secado por aspersión desarrollado por Boudart.

En este proceso el látex de papaya es agitado, centrifugado, filtrado para eliminar microorganismos y finalmente secado por aspersion. Comparada con la papaína cruda normal es varias veces más activa, contiene menos contaminación bacteriana y es completamente soluble pudiendo ser utilizada directamente en muchas aplicaciones.

Refinamiento de la papaína cruda secada por otros métodos.- Debe limpiarse el látex para eliminar impurezas solubles e insolubles para lo cual se disuelve la papaína cruda, se filtra y se precipita con un solvente, se realiza una segunda filtración y se seca el precipitado. Es muy usual el uso de estabilizadores sulfhidrúlicos como bisulfito y cisteína antes de la precipitación.

Ficina.- Se importa principalmente de Sudamérica y se obtiene del látex de los árboles tropicales de higo del género Ficus.

Existen más de 2000 especies de este género y la actividad varía considerablemente de una especie a otra. La mayoría de las preparaciones comerciales provienen de *F. glabrata*. El látex se recolecta mediante incisiones o cortes en el árbol y el jugo es separado después que el caucho del látex se ha coagulado.

La enzima se recupera del jugo precipitándola con acetona o bien secándola por aspersion.

RENDIMIENTO DE ENZIMAS PROTEOLITICAS DE ORIGEN VEGETAL

PAPAINA: De un árbol de papayo se obtienen 400 gramos de látex y 70 gramos de papaína cruda comercial.

BROMELINA: (fruto). Se obtienen de 2 a 3 gramos de enzima cruda por cada litro de jugo.

2.2.3. Estabilización de enzimas comerciales

Las enzimas se venden como productos sólidos o líquidos en base a su potencia, ya sea concentradas o diluidas a actividades estándares.

Los productos líquidos suelen requerir de estabilizadores para evitar el crecimiento microbiano así como la disminución o pérdida de la actividad enzimática durante el almacenamiento. Entre algunos agentes empleados se encuentran el benzoato de sodio, glicerol, propilenglicol, sorbitol y cloruro de sodio. Los productos sólidos se ajustan a potencias estándares mediante la adición de almidón, lactosa, dextrosa, sacarosa, sales, gelatina y caseína.

Por ejemplo en el caso de ablandadores de carnes se utilizan soluciones amortiguadoras de papaína adsorbidas en cloruro de sodio. Existen otras preparaciones más elaboradas que incluyen el uso de bromelina combinada con cloruro de sodio, azúcar, saborizantes y grasa para ser inyectadas a la carne.

En ocasiones se incorporan reductores en las formulaciones. Para la papaína se sugiere el uso de bisulfito de sodio.

2.2.4. Métodos de ensayo

Es importante la medición de la actividad proteolítica ya que es un criterio importante de calidad tanto para el productor como para el usuario o consumidor. Cuando las proteasas son usadas en procesos de alimentos, los sustratos naturales son proteínas y por tanto aquellos ensayos donde el sustrato es una proteína son los más apropiados.

Los sustratos más utilizados son la caseína, gelatina, hemoglobina, sero-albúmina y edestina.

Se han reportado diferentes métodos para la determinación de la actividad proteolítica siendo los más utilizados el Método de Anson (16) el cual utiliza como sustrato hemoglobina desnaturalizada con urea y el método modificado de Kunitz (17) donde el sustrato es la caseína.

Ambos métodos se basan en la hidrólisis del sustrato por un tiempo determinado, en condiciones de temperatura y pH controladas. Se precipita la proteína no hidrolizada con ácido tricloroacético, determinándose tirosina y triptofano de péptidos de bajo peso molecular ya sea por colorimetría (reactivo de Folin-Ciocalteu) (18) o bien cuantificándolos en un espectrofotómetro por su absorban-

cia a 280 nm.

En otras determinaciones colorimétricas se utiliza - ninhidrina para cuantificar el Nitrógeno proteico a partir de una curva estandar de sulfato de amonio (19).

Por último mencionaré el método basado en el tiempo de coagulación de la leche, el cual es un ensayo de bajo costo que requiere de un mínimo de equipo. Este ha sido utilizado tradicionalmente para las proteasas vegetales - (25).

2.2.5. Principales aplicaciones comerciales de las proteasas vegetales

A. Clarificación y estabilización de cerveza:

Durante la elaboración de la cerveza, parte de la -- proteína que es soluble a temperatura ambiente es capaz -- de precipitar con el enfriamiento causando turbidez, misma que desaparece con el calentamiento. Este fenómeno se debe principalmente a la condensación o combinación de -- proteínas de alto peso molecular con material polifenólico (taninos) (21); los carbohidratos, (glucosa, arabinosa y xilosa) sílice y metales pesados (Cu, Fe) contribuyen -- en menor proporción (22).

La papaína digiere las proteínas en un medio ligeramente ácido (pH 4-5) previniendo así la precipitación de la proteína en la cerveza fría. Por lo general se adiciona cerca de 1 gramo de papaína comercial por barril (8 -

ppm), antes de la pasteurización a 60 °C. Esta temperatura no es tan severa como para desnaturalizar a la enzima en grado apreciable.

B. Ablandamiento de carnes:

Este es el segundo uso mayor de la papaína comercial.

La conversión del músculo a carne después de matar al animal incluye la actuación de varios sistemas enzimáticos. Las enzimas glicolíticas convierten el glucógeno y glucosa a ácido láctico, resultando una disminución de la solubilidad y propiedades de retención de agua de las proteínas. La miosina ATPasa y la creatina cinasa causan la reducción de la creatina fosfato y del ATP, lo cual permite al músculo entrar en rigor mortis. En este estado el músculo es muy rígido y duro, es por esto que debe dejarse madurar para permitir que se vuelva suave.

Una parte importante de este proceso lo llevan al cabo la acción de proteasas endógenas en el sistema contráctil (en particular de la línea Z del sarcómero) y puede acelerarse en forma satisfactoria con la adición de enzimas proteolíticas. Dentro de éstas se incluye a la papaína, ficina, bromelina y algunas enzimas microbianas.

Los productos comerciales para este propósito contienen 2% de papaína y cantidades variables de sal, glu-

cosa, glutamato monosódico, agentes saborizantes y especias. El polvo se aplica a la carne antes del cocimiento introduciéndolo en los tejidos con ayuda de un tenedor, posteriormente el cocimiento de la carne se realiza en forma usual.

Se ha visto que la forma más efectiva de aplicación es por inyección de la enzima dentro del animal minutos antes de su muerte. De esta forma la enzima es llevada por todo el sistema vascular hacia el cuerpo del animal, ejerciendo su acción ablandadora después de la muerte -- del mismo.

La dosis recomendada para la inyección anterior es de aproximadamente 5 ppm de papaína comercial basada en el peso vivo del animal. Se ha reportado que la enzima debe estar oxidada antes de la inyección ya que puede reactivarse por grupos sulfhidrúlicos propios de la carne. Algunas patentes describen la oxidación de la papaína -- con agua oxigenada (la cual es eliminada por acción de una catalasa) o bien con disulfuros.

Se han visto resultados positivos inyectando la enzima en los animales recientemente muertos colocando las agujas de tal forma que se permita una distribución intramuscular de la enzima.

El uso de la ficina y bromelina para el ablandamiento de carnes se restringe debido a su disponibilidad y costo.

C. Producción de sabores:

La producción de compuestos saborizantes mediante la hidrólisis parcial de proteínas ocupa el tercer lugar en cuanto a la aplicación de proteasas vegetales. Estos hidrolizados enzimáticos pueden prepararse utilizando como sustratos la proteína de soya, el gluten de trigo o bien proteínas de la leche.

Dentro de la poca información publicada sobre este tema se encuentra la formación de péptidos amargos debida a la hidrólisis enzimática de las proteínas. Se ha aceptado que el amargor es resultado de la secuencia de aminoácidos de la proteína. Ney (32) ha observado que el sabor amargo en los péptidos está correlacionado con la proporción de aminoácidos hidrofóbicos presentes, por lo tanto un hidrolizado enzimático será amargo si una proteasa particular libera un péptido que contenga una alta proporción de residuos de aminoácidos hidrofóbicos.

Uno de los usos potenciales de las proteasas en la industria de alimentos y que todavía no se conoce a fondo como las aplicaciones antes citadas, es la modificación enzimática de las propiedades funcionales de las proteínas de los alimentos.

La aplicación de proteasas es un medio atractivo para obtener mejores propiedades funcionales de las proteínas de los alimentos sin deteriorar su valor nutritivo. (28). La degradación de las proteínas en péptidos de diferente longitud generalmente vuelve al producto más solu

ble, especialmente en el punto isoeléctrico. Sin embargo otras propiedades funcionales como la viscosidad, capacidad emulsificante y capacidad de absorción de agua se ven influenciadas.

Durante las últimas décadas la producción industrial de alimentos ha creado una demanda de proteínas no convencionales con propiedades funcionales particulares.

Entre los trabajos más recientes (1978) se encuentra el estudio de la hidrólisis enzimática de las proteínas de soya realizado por Sejr Olsen, H., y Adler-Nissen J. (31). Estos investigadores consideran que el uso potencial de la proteína de soya como ingrediente en muchos alimentos de pH bajo como son bebidas y refrescos, depende del perfil de solubilidad del producto protéico. El uso de proteínas de soya solubles en su punto isoeléctrico tiene grandes ventajas para aplicaciones de este tipo.

Se sabe que las propiedades funcionales de la mayoría de los productos de proteínas de soya disponibles comercialmente, son pobres a pH cercanos al punto isoeléctrico, de ahí que el uso de proteínas de soya modificadas enzimáticamente parece ofrecer buenas posibilidades para mejorar el valor nutritivo de alimentos de pH bajo.

La División de Enzimas de Industrias Novo ha realizado hidrólisis enzimáticas de proteínas de soya a escala piloto con resultados satisfactorios, obteniendo productos libres de sabores amargos. Las condiciones óptimas que han encontrado, utilizando una enzima proteolítica --

proveniente de *Bacillus licheniformis* (Alcalasa 0.6 L, - Enzimas Novo) son: sustrato protéico 8%, tiempo de hidrólisis 2 horas, relación protéica de enzima-sustrato 2%, pH 8.0 y temperatura de 50 °C. Los sustratos más convenientes resultaron ser los aislados y concentrados de proteína de soya.

2.2.6. Proteasas microbianas

Las proteasas microbianas de interés, desde el punto de vista de su aplicación en la industria alimentaria, son enzimas extracelulares. El número de microorganismos que secretan proteasas es extraordinariamente grande.

Estas enzimas se han agrupado conjuntamente ya que tienen un origen común: los microorganismos.

Entre éstas se encuentran las proteasas fúngicas y las bacterianas. Las primeras se emplean para modificar las proteínas del trigo utilizadas en panificación y en el ablandamiento de carnes; además tienen un papel importante en la producción de quesos. Las proteasas bacterianas se aplican en menor proporción siendo utilizadas en la clarificación de cerveza, en la producción de hidrolizados de proteínas y como suplementos en alimentos para ganado.

Entre los principales microorganismos utilizados -

para la producción de estas enzimas se encuentran el Aspergillus saitoi, Aspergillus oryzae, Aspergillus niger y Bacillus subtilis.

En comparación con las proteasas vegetales tienen una baja estabilidad térmica. Por ejemplo, las proteasas de A. oryzae pierden rápidamente la actividad enzimática al someterlas a 50 °C por un período de 30 minutos. Su especificidad es más amplia respecto a los enlaces peptídicos de las cadenas protéicas.

La producción de proteasas microbianas se ha incrementado en los últimos años debido a las grandes ventajas económicas y técnicas que presentan.

MATERIALES Y METODOS

MATERIA PRIMA.- Para la extracción de enzimas proteolíticas se utilizaron exclusivamente las hojas de Chaya. Todos los lotes de hojas provienen de Villahermosa, Tabasco.

Debido a que los arbustos de Chaya brava presentan un follaje más abundante y hojas más grandes y gruesas, se decidió hacer las extracciones con esta especie.

RECEPCION DE LA MATERIA PRIMA.- Las hojas se recibieron en bolsas de polipropileno, las que resultaron ser más apropiadas permitiendo a la hoja una aereación adecuada.

SELECCION DE LAS HOJAS.- Se seleccionaron las hojas no maltratadas y se dividieron en dos grupos:

A) HOJAS FRESCAS

B) HOJAS SECAS.- Las hojas recién seleccionadas fueron secadas en un secador de túnel, a una temperatura de 40 - 50 °C, con el fin de no desnaturalizar las enzimas presentes en las mismas. El contenido de humedad promedio del-

producto seco fue de 4%.

3.1. Análisis bromatológico

En el momento de recibir las hojas se hicieron las siguientes determinaciones de acuerdo a los métodos oficiales de análisis de la AOAC (33).

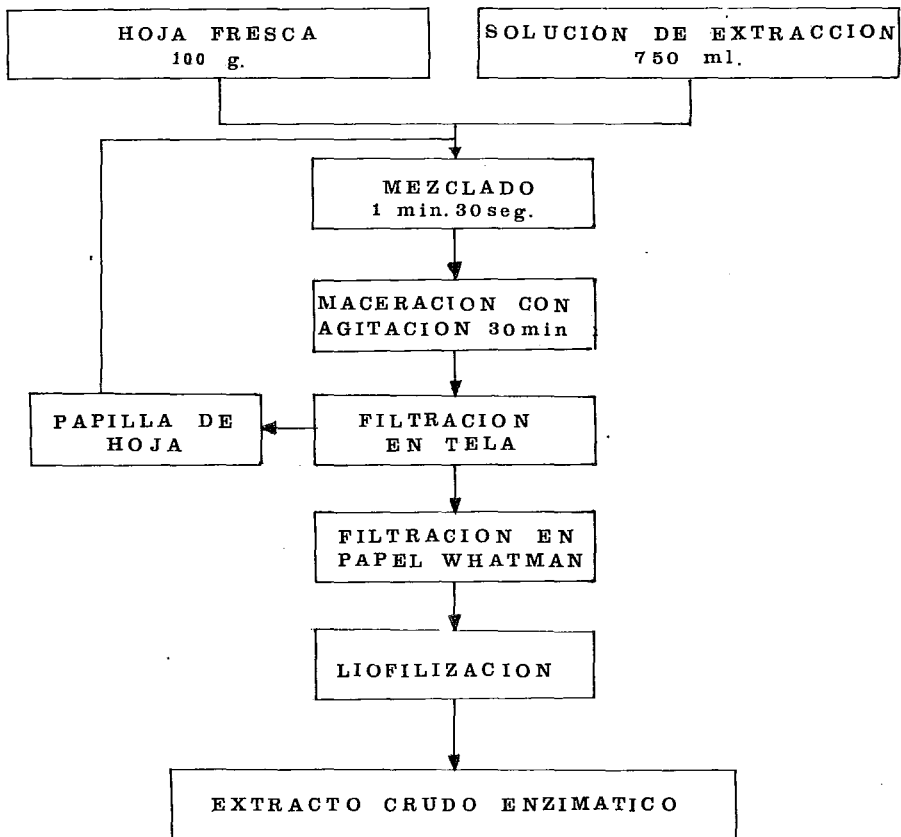
- 1.- Humedad.- (27.3)
- 2.- Proteínas.- Método de Kjeldahl (2.25). Para todas las determinaciones, el factor utilizado fue 6.0. Pinner en 1955 sugiere el uso de este factor para la determinación de proteínas de origen vegetal, el cual se basa en un contenido de Nitrógeno protéico de 16.67%.
- 3.- Fibra cruda.- (27.28)
- 4.- Extracto etéreo.- Método de Soxhlet (27.25)
- 5.- Cenizas.- (27.9)
- 6.- Carbohidratos.- Determinados por diferencia.

3.2. Extracción de enzimas proteolíticas

Las hojas secas (A) y frescas (B) se sometieron al proceso de extracción (Fig 1*), un día después de su recepción.

Para las extracciones con las hojas secas se pesó el equivalente a las hojas frescas (aproximadamente 19.5 g).

FIG 1* DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROCESO
DE EXTRACCION



Equipo utilizado para la extracción:

1. Balanza granataria Triple Beam OHAUS.
2. Licuadora Osterizer de 4 velocidades.
3. Agitador magnético MAG-MIX 65906.
4. Potenciómetro Beckman Modelo H-2.
5. Liofilizadora USIFROID Refutord, Modelo SMJ.

La liofilización se utilizó con el fin de conservar los extractos crudos provenientes de un mismo lote para su posterior estudio (34).

Se ha reportado en la literatura la pérdida de actividad enzimática de soluciones acuosas de ficina que han sido liofilizadas (15-b), de igual manera en el caso de la pinguinaína (12), razón por la cual se hizo una prueba sobre el material liofilizado con el fin de determinar si se afectó la actividad enzimática.

3.2.1. Efecto del proceso de liofilización

Se tomó un volumen conocido del extracto crudo líquido y se liofilizó. Posteriormente el producto sólido se rehidrató con agua destilada al volumen inicial. De esta solución se tomó un volumen "X" para la determinación de la actividad proteolítica. Se tomó el mismo volumen "X" del extracto crudo líquido antes del proceso de liofilización, determinándose la actividad proteolítica correspondiente bajo las mismas condiciones.

Estas determinaciones se realizaron a pH 6.0, temperatura de 40 °C y tiempo de hidrólisis de 50 minutos (Método descrito en 3.3.)

3.2.2. Soluciones para la extracción

Comunmente la extracción de proteasas vegetales se lleva al cabo en soluciones acuosas y en soluciones salinas diluídas, en las cuales la mayoría de las enzimas son estables. Es muy común el uso de soluciones de NaCl.

Witt y Tousignant (35) utilizaron soluciones de K_2SO_4 al 5% para la extracción de proteasas de la malta, obteniendo actividades proteolíticas altas.

Se ha observado la estabilización de enzimas durante su extracción y preparación, mediante la adición de agentes reductores como la cisteína (41).

Las enzimas tiólicas son inhibidas por pequeñas cantidades de iones metálicos pesados, siendo además muy sensibles a la oxidación. Para evitar estos factores que inactivan a las proteasas se utilizan agentes quelantes como el EDTA y agentes protectores como la cisteína (15-c).

La extracción de estas proteasas generalmente se lleva al cabo en valores de pH cercanos a la neutralidad (6 - 7.5) con el fin de no desnaturalizar las proteínas.

La extracción de la mexicana se realiza a pH de 7.5, en el caso de la asclepaína a pH de 7.0 y para la -

papaína a 6.7 (15-a).

En base a las consideraciones antes citadas, se utilizaron diferentes soluciones, con el fin de obtener la que proporcione mayor actividad específica.

a) Soluciones con K_2SO_4

- K_2SO_4 5% + EDTA (1.4 g/100 ml de solución), pH=6.0, 1a y 2da extracción.

- K_2SO_4 5%, pH=6.0

Se ajustaron las soluciones a un pH cercano a la neutralidad.

La primera se utilizó para la extracción de hojas -- frescas y secas, mientras que la segunda solo para las hojas frescas.

Con el fin de determinar si queda proteína enzimáticamente activa en la papilla residual, se realizó una segunda extracción sobre ésta, siguiendo el mismo procedimiento.

b) Soluciones con NaCl

- NaCl 0.5% + EDTA (1.4 g/100 ml), pH=6.0

- NaCl 0.5%, pH=6.0

Las extracciones se hicieron con las hojas frescas.

c) Soluciones con $NaHSO_3$

- $NaHSO_3$ 1% + EDTA (1.4 g/100 ml), pH=4.6

- $NaHSO_3$ 2% + EDTA, pH=4.6, 1a y 2da extracción.

- $NaHSO_3$ 2%, pH=4.6

- NaHSO_3 2% + EDTA, pH=6.0

- NaHSO_3 2%, pH=6.0

El pH natural de las soluciones de NaHSO_3 al 2% + -- EDTA es de 4.6. No se ajustó el pH a 6.0 para observar - el efecto de éste en la extracción de las proteasas y para aprovechar el efecto antioxidante de la solución.

Se prepararon soluciones de pH=6.0 con el fin de comparar con las demás soluciones de extracción.

Las extracciones se hicieron con las hojas frescas.

d) Solución de referencia

- Agua destilada, pH=7.0 (hoja fresca).

Todas las soluciones se refrigeraron antes del proceso de extracción.

3.3. Determinación de Actividad Proteolítica

Se utilizó el método propuesto por el Food Chemical-Codex en 1966 (36), en el cual se emplea como sustrato -- protéico a la caseína.

REACTIVOS:

1. Caseína. Grado Hammersten. Nutr. Bioch. Corp.
2. Cisteína. HCl. H_2O Nutr. Bioch. Corp. Fisher Scienti--fic Co.
3. L-tirosina. Grado cromatográfico. Mann Research Lab.
4. Fosfato disódico.- Na_2HPO_4

5. Acido cítrico.
6. Acido tricloroacético.
7. Dihidrato disódico de etilendiamino tetracetato. ----
EDTA Na_2H_2

EQUIPO:

1. Espectrofotómetro PYE UNICAM SP 30 UV.
2. Baño de temperatura constante.
3. Matraces aforados de 50, 100, 500 y 1 000 ml.
4. Pipetas graduadas de 1, 2, 5 y 10 ml.
5. Tubos de ensayo de 25 x 150 mm.
6. Tapones de neopreno.
7. Cronómetro.
8. Embudos.
9. Papel Filtro Whatman No. 42
10. Potenciómetro Beckman Modelo H-2

SOLUCIONES:

- Fosfato disódico 0.05 M.- Se disuelven 7.1 g de Na_2HPO_4 anhidro en suficiente cantidad de agua y se afora a 1 litro con agua destilada. Se añade una gota de tolueno como conservador.
- Acido cítrico 0.05 M.- Se disuelven 10.5 g de ácido cítrico monohidratado en agua y se afora a 1 litro. Se añade una gota de tolueno como conservador.
- Acido tricloroacético (30%).- Se disuelven 30 gramos en agua y se afora a 100 ml con agua destilada.

- Sustrato de caseína: Se disuelve un gramo de caseína - tipo Hammersten en 50 mililitros de fosfato disódico -- 0.05 M. Se coloca en un baño de agua en ebullición durante 30 minutos con agitación ocasional. Se enfría a temperatura ambiente y se añade ácido cítrico 0.05 M para ajustar el pH a 6.0 ± 0.1 . La solución debe agitarse rápidamente y de modo continuo durante la adición de ácido cítrico para evitar la precipitación de la caseína. Se afora a 100 mililitros con agua destilada. Se prepara todos los días.
- Solución amortiguadora de cisteína-fosfato-versenato.-- En un matraz aforado de 500 ml se disuelven 3.55 g de Na_2HPO_4 en 400 ml de agua. Se añaden 7.0 g de EDTA --- Na_2H_2 y 3.05 g de cisteína. HCl. H_2O . Se ajusta el pH a 6.0 ± 0.1 con HCl 1 N ó NaOH 1 N y se afora al volúmen con agua destilada. Se prepara todos los días.

Preparación de la solución problema:

Se pesaron en balanza analítica de 100 a 300 mg del extracto crudo enzimático, se disolvieron y aforaron con la solución amortiguadora a 50 ml. Se pesó la cantidad necesaria de liofilizado para obtener lecturas de absorbancia entre 0.2 y 0.6, usando una celda de 10 mm y el "blanco" para ajustar a cero.

PROCEDIMIENTO:

En cada 3 tubos de ensayo (25 x 150 mm), provistos de tapón, se agregan 5.0 ml de la solución de caseína al 1%. Se ajusta el baño de temperatura controlada a 40 °C y se deja estabilizar por 30 minutos. Las pruebas se corren por duplicado. A cada uno de los 2 tubos se agre--gan 2.0 ml de la solución problema, se mezcla bien con - agitación rotatoria y se anota el tiempo cero. Se vuelven a colocar en el baño a 40 °C después de un tiempo de terminado; se agregan a todos los tubos (incluyendo el - blanco o tubo # 3) 3.0 ml de ácido tricloroacético al -- 30% y se agita vigorosamente. Al tercer tubo (blanco) - se agregan 2 ml de la solución enzimática. Se colocan - todos los tubos en el baño a 40 °C durante 35 minutos. - Se filtra el contenido de los tubos usando papel filtro- Whatman No. 42. Los filtrados deben ser completamente - claros y brillantes. Finalmente en una celda de 10 mm, - a 280 nm se lee la densidad óptica de la muestra contra- la del blanco.

CALCULOS PARA LA ACTIVIDAD

Unidad de actividad.- Se define como aquella canti- dad de enzima que al actuar sobre el sustrato de caseí-- na, bajo las condiciones especificadas, produce un micro gramo de tirosina por minuto.

La actividad específica o potencia se define como:

$$\frac{\text{Microgramos de tirosina/min}}{\text{mg de proteína}} = \frac{\text{Unidades}}{\text{mg de proteína}}$$

CURVA ESTANDAR DE TIROSINA

La solución estandar de referencia se prepara disolviendo 100 mg de L-tirosina en 60 ml de HCl 0.1 N, aforando a un litro con agua destilada. Esta solución contiene 100 microgramos de tirosina por mililitro. Se preparan soluciones de 20, 40, 60 y 80 microgramos de tirosina/ml, diluyendo respectivamente 20, 40, 60 y 80 ml de la solución estandar al aforar a 100 ml con agua destilada.

Se lee la densidad óptica a 280 nm y se grafican los valores de absorbancia en función de los microgramos de tirosina. La recta obtenida debe tener un valor de pendiente entre 0.0064 y 0.0066 pasando por el origen.

Cálculos:

$$\text{Pendiente (m)} = \frac{\text{D.O.} \cdot \frac{10 \text{ mm}}{280 \text{ nm}}}{\mu\text{g tirosina/ml}}$$

$$\frac{\mu\text{g tirosina}}{\text{min}} = \frac{(\text{D.O.}) (10 \text{ ml})}{\text{min} \times \text{m}}$$

$$\text{Actividad específica} = \frac{\mu\text{g de tirosina}}{\text{min} \times \text{mg proteína}}$$

La pendiente obtenida fue de 0.00653

3.4. Determinaciones. Extractos crudos liofilizados

- La papilla residual de la extracción, fue secada en una estufa a 50 °C. En el producto seco se determinaron -- proteínas totales por el método de Kjeldahl (N x 6.0).
- Se determinó el contenido protéico en cada uno de los - extractos crudos, con el fin de poder determinar las ac tividades específicas.

3.4.1. Actividad enzimática de los extractos crudos lio-- filizados (E. C. L.)

Las determinaciones se realizaron siguiendo el método anteriormente descrito, siendo las condiciones de ensayo - las siguientes:

Sustrato = caseína 1%

Temperatura = 40 °C

Tiempo de hidrólisis enzimática = 30, 45 y 60 min.

Todos los ensayos se llevaron por duplicado con sus - respectivos blancos.

Los resultados se grafican en microgramos de tirosina

liberada por mg de proteína adicionada, en función del --- tiempo de hidrólisis (min).

Determinación de actividad enzimática de muestras de papaína para fines comparativos

Se determinó la actividad específica de papaína comercial y no comercial. Las condiciones del ensayo fueron -- las siguientes:

- Sustrato = caseína 1 %
- pH = 6.0
- Temperatura = 40 °C
- Tiempo de hidrólisis = 50 min.
- La concentración de enzima utilizada, se expresa en % de proteína respecto a la del sustrato (E/S):
 - a) Papaína refinada concentrada de Enzimos Mexicanos S.A.
E/S = 0.28%
 - b) Papaína no comercial proporcionada por los laborato-- rios de la Grain Processing Corporation. Conentra-- ción de enzima utilizada E/S = 0.16%.

3.4.2. Efecto de la temperatura

Estas pruebas se realizaron con los extractos crudos-- obtenidos con soluciones de K_2SO_4 (Hojas frescas).

Condiciones del ensayo:

- Sustrato = caseína 1%

- pH = 6.0
- Temperaturas = 40, 50, 60, 70, 80 y 90 °C
- Tiempos de hidrólisis enzimática = 30, 40, 50, y 60 minutos para cada temperatura.
- Concentración de enzima utilizada para cada ensayo como E/S (%):

Temp °C	K ₂ SO ₄ 5% + EDTA, pH=6.0	K ₂ SO ₄ 5%, pH=6.0
40	3.17 %	1.16 %
50	3.17 %	1.16 %
60	1.58 %	0.58 %
70	0.79 %	0.29 %
80	0.79 %	0.29 %
90	0.79 %	1.16 %

Los resultados se grafican en microgramos de tirosina/mg de proteína en función del tiempo (min), para cada temperatura.

Temperaturas óptimas.- Se grafica el % de actividad en función de la temperatura (°C), para 30 y 50 minutos de hidrólisis enzimática. El 100 % corresponde a la máxima actividad específica alcanzada.

3.4.3. Pruebas de termoestabilidad

Se realizaron con los extractos de las soluciones de K₂SO₄ (Hojas frescas). Estos se disolvieron en la solución

amortiguadora de fosfato-cisteína-versenato y se sometieron a las siguientes temperaturas: 40, 50, 60, 70 y 80 °C, por diferentes lapsos de tiempo: 15, 30, 45 y 60 minutos.

Las alícuotas tomadas cada 15 minutos se enfriaron rápidamente para la correspondiente determinación de actividad proteolítica.

Condiciones de ensayo:

- Sustrato = caseína 1%
- pH = 6.0
- Temperatura = 40 °C
- Tiempo de hidrólisis = 50 minutos
- Concentración de enzima utilizada:
K₂SO₄ 5% + EDTA, pH=6.0 E/S = 3.46%
K₂SO₄ 5%, pH=6.0 E/S = 2.0%

Los resultados se grafican en % de actividad residual, considerando 100 % al tiempo cero de incubación de la solución enzimática.

3.4.4. Efecto del pH

El ensayo enzimático se realizó con los extractos crudos de soluciones de K₂SO₄ (Hojas frescas), y para fines comparativos también se utilizó el correspondiente a la solución de NaHSO₃ 2% + EDTA, pH=4.6 (Hojas frescas).

El sustrato protéico para la determinación de actividad proteolítica se ajustó a los siguientes pH: 5.6, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13. Las demás condiciones del ensayo son:

- Temperatura = 40 °C
- Tiempo de hidrólisis = 60 minutos
- Las diferentes concentraciones de enzima fueron las siguientes:

K_2SO_4 5% + EDTA, pH=6.0 E/S = 1.58%

K_2SO_4 5%, pH=6.0 E/S = 1.45%

$NaHSO_3$ 2% + EDTA, pH=4.6 E/S = 1.54%

Los resultados se grafican en % de actividad, considerando 100 % al valor de actividad específica mayor.

3.4.5. Rendimiento de enzima extraída

Se midió un volúmen del extracto crudo de mayor actividad y se pesaron los sólidos obtenidos después del proceso de liofilización. Todas las determinaciones se hicieron por triplicado.

Los rendimientos se presentan en gramos de sólidos por 100 ml de filtrado (valor promedio).

IV

RESULTADOS

ANALISIS BROMATOLOGICO

A continuación se presenta el valor promedio de 3 lotes diferentes de hojas de Chaya así como el análisis de referencia reportado por la League for International Food Education (1973).

COMPONENTE	ANALISIS PROMEDIO	ANALISIS DE REFERENCIA
HUMEDAD	80.8 %	81.1 %
PROTEINAS (B.S.)	34.5 % (N x 6)	32.75%
FIBRA CRUDA (B.S.)	13.81%	13.54%
EXTRACTO ETereo (B.S.)	6.76%	10.10%
CENIZAS (B.S.)	10.29%	11.10%
CARBOHIDRATOS (B.S.)	34.64%	32.0 %

Observaciones.- El valor de extracto etéreo encontrado fue menor al reportado a pesar de haberse extraído la hoja en agua, antes de la determinación. Las determinaciones se hicieron por triplicado, encontrándose siempre valores muy cercanos al 6%.

EFFECTO DEL PROCESO DE LIOFILIZACION

No se observaron cambios en la actividad proteolítica determinada antes y después de liofilizar los filtrados enzimáticos.

Los resultados encontrados con los E.C.L. obtenidos con K_2SO_4 al 5%, pH=6.0 fueron los siguientes:

- Antes de la liofilización: $656.66 \frac{Mg \text{ de tirosina}}{mg \text{ proteína}}$

- Después de la liofilización: $676.49 \frac{Mg \text{ de tirosina}}{mg \text{ proteína}}$

Los resultados obtenidos se encuentran dentro del -- rango de error experimental (3.0%).

CONTENIDO PROTEICO DE LAS PAPILLAS RESIDUALES DE LA EX -- TRACCION Y DE LOS EXTRACTOS CRUDOS LIOFILIZADOS (B.S.)

Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla -- No. 4 así como los valores de actividad específica obtenidos de los gráficos a los 45 minutos.

Las determinaciones no graficadas, se desarrollaron en igual forma que las hidrólisis anteriormente citadas - (los extractos crudos provienen de lotes diferentes, por eso no se grafican conjuntamente con las demás hidróli-- sis).

T A B L A 4

SOLUCION DE EXTRACCION	CONTENIDO DE PROTEINAS TOTALES (% B.S.)				ACT. ESPECIFICA Unidades/mg prot	
	PAPILLA		LIOFILIZADO		E. C. L.	
	+ EDTA	- EDTA	+ EDTA	- EDTA	+ EDTA	- EDTA
Agua destilada		13.38		38.92		1.44
K_2SO_4 5%, pH=6.0 1a. ext.	18.11	17.90	15.21	7.24	6.11	12.44
K_2SO_4 5%, pH=6.0 2da. ext.			9.62	1.92	1.0	2.88
K_2SO_4 5%, pH=6.0 HOJA SECA			13.25	5.98	5.55	17.55
$NaHSO_3$ 1%, pH=4.6	23.28		27.24		1.66	
$NaHSO_3$ 2%, pH=4.6 1a. ext.	23.71	19.25	21.35	10.14	2.77	8.66
$NaHSO_3$ 2%, pH=4.6 2da.ext.	9.3		19.80		1.22	
$NaHSO_3$ 2%, pH=6.0	24.54		21.55	13.80	3.77	9.66
$NaCl$ 0.5%, pH=6.0		14.72	34.06	24.78	3.88	7.88

Observaciones. -

1. Tanto el agua destilada, como las soluciones salinas-diluidas permiten una mayor solubilidad de las proteínas, sin embargo sólo una pequeña porción de éstas --son enzimáticamente activas.
2. La papilla resultante de la extracción presenta un --contenido relativamente alto de proteínas, comparable al contenido protéico de la alfalfa (15-22% B.S.)
3. En el caso de utilizar soluciones de K_2SO_4 al 5%, ---pH=6.0, no es recomendable una segunda extracción, ya que la actividad proteolítica residual en la papilla--es mínima.
4. El secado de las hojas en las condiciones anteriormente descritas no causa desactivación de las enzimas. - Se observa que la actividad específica encontrada, en el caso de usar hojas secas es muy similar e incluso ve más alta que la del extracto obtenido de las hojas frescas.
5. La extracción de proteínas de las hojas de Chaya es -cerca del doble al utilizar soluciones con versenato--en comparación con los valores obtenidos al emplear -soluciones exentas de este compuesto. Esto se debe a la solubilización de proteínas que se encuentran estabilizadas por metales divalentes como son el Ca y Mg, en las membranas celulares.
6. La actividad específica determinada al utilizar solu-

ciones con EDTA, es cerca de la mitad de la encontrada con aquellas libres de este compuesto, lo cual indica que la enzima posiblemente requiere de ciertos metales para su estabilización.

ACTIVIDAD ENZIMATICA CON LOS DIFERENTES EXTRACTOS CRUDOS LIOFILIZADOS

1.- Actividad enzimática de los extractos crudos obtenidos con soluciones de NaCl 0.5%.

En comparación con los valores determinados para el extracto acuoso de referencia (pH=7.0), la solución de extracción más eficiente es la de NaCl 0.5%, pH=6.0 --- (GRAFICO No. 2)

2.- Actividad enzimática de los extractos crudos obtenidos con soluciones de NaHSO₃.

La solución más eficiente es la de NaHSO₃ 2%, pH=6.0.

Considerando la actividad específica de los extractos obtenidos a pH=6.0 como el 100%, para 45 minutos de hidrólisis se tiene lo siguiente:

- NaHSO₃ 2% + EDTA, pH=4.6 = 73.47 %
- NaHSO₃ 2%, pH=4.6 = 89.65 %

La actividad específica se incrementa en un 66.86% al cambiar la concentración de NaHSO₃ del 1 al 2%.

Para este tipo de soluciones se recomienda una segunda extracción, ya que la papilla presenta todavía pro

teínas enzimáticamente activas (GRAFICO No. 3).

3.- Actividad enzimática para los extractos crudos obtenidos con soluciones de K_2SO_4 5%.

La solución más eficaz es la de K_2SO_4 5%, pH=6.0, - lo cual se debe a su mayor capacidad en la extracción - de proteínas con actividad proteolítica.

De todas las soluciones utilizadas para la extracción, ésta fue la que permitió la máxima actividad enzimática. (GRAFICO No. 4)

4.- Actividad enzimática del E.C.L. obtenido con K_2SO_4 5%, pH=6.0.

La actividad específica encontrada fue de 23.13 unidades/mg proteína para 50 minutos de hidrólisis. ---- (GRAFICO No. 5).

Para fines comparativos se encontraron los siguientes valores para la papaína comercial y no comercial:
Papaína (ENMEX, S. A.): 78.8 unidades/mg proteína.
Papaína no comercial (G.P.C.): 251.78 unidades/mg proteína.

La papaína purificada es 10 veces más activa que - las proteasas extraídas de las hojas de Chaya y la papaína comercial 3.4 veces.

EFFECTO DE LA TEMPERATURA

1.- Efecto de la temperatura en la actividad enzimática de proteasas extraídas con K_2SO_4 5% + EDTA, pH=6.0.

En los GRAFICOS No. 6, 8 y 9 se observa que la máxima actividad proteolítica se alcanza a los 70 °C para 30 y 50 minutos de hidrólisis.

La enzima empieza a desnaturalizarse arriba de los 70 °C.

2.- Efecto de la temperatura en la actividad enzimática de proteasas extraídas con K_2SO_4 5%, a pH=6.0.

En los GRAFICOS No. 7, 8 y 9 se observa que la máxima actividad proteolítica a los 30 minutos de hidrólisis es de 80 °C y a los 50 minutos de 70 °C, lo cual indica que a una incubación mayor de la enzima la temperatura operacional será menor que la óptima debido a la inestabilidad térmica.

La disminución de la actividad por efecto prolongado de calentamiento es mucho mayor para las soluciones sin versenato. (GRAFICO No. 8).

PRUEBAS DE TERMOESTABILIDAD

Los extractos crudos en presencia de EDTA, son más estables al calor, presentándose la total desnaturalización de la enzima a los 80 °C con los E.C.L. de K_2SO_4 5%

pH=6.0. El versenato presenta una acción protectora--
contra la desnaturalización térmica de la enzima. ---
(GRAFICO No. 10).

Los extractos crudos exentos de versenato presen-
tan una menor estabilidad térmica (GRAFICO No. 11).

Los tiempos de vida media encontrados para los ex-
tractos son:

	K_2SO_4 5% + EDTA, pH=6.0	K_2SO_4 5%, pH=6.0
60 °C	40.0 min	35 min
70 °C	23.5 min	6 min
80 °C	8.5 min	-

Valores comparativos con otras enzimas:

Papaína	$t_{\frac{1}{2}} = 56$ min a 75 °C.
Asclepaína m	$t_{\frac{1}{2}} = 78$ min a 60 °C.
Bromelina	$t_{\frac{1}{2}} = 21.5$ min a 60 °C.

En base a estos valores, se observa que las pro---
teasas extraídas de las hojas de Chaya son más estables
térmicamente que la bromelina, no así en el caso de la-
papaína y asclepaína m.

EFEECTO DEL pH

El pH óptimo encontrado para los extractos obteni-
dos con K_2SO_4 y $NaHSO_3$ 2% + EDTA, pH=4.6, se localiza -

en regiones alcalinas.

-K ₂ SO ₄ 5% + EDTA, pH=6.0	9-11
-K ₂ SO ₄ 5%, pH=6.0	7-11
-NaHSO ₃ 2% + EDTA, pH=4.6	10-11

(GRAFICOS No. 12 y No. 13).

El extracto enzimático obtenido con K₂SO₄ 5%, pH=6.0 permite trabajar en un rango mayor de pH, lo cual representa ventajas para la aplicación de estas enzimas en procesos de alimentos. (GRAFICO No. 13).

Existe una mayor desnaturalización por efecto de pH en los extractos libres de versenato a valores de pH mayores de 12.5.

RENDIMIENTOS DE ENZIMA CRUDA

Para los E.C.L. obtenidos con K₂SO₄ 5%, pH=6.0 se obtuvieron los siguientes resultados:

- 6.6 g de sólidos/100 ml de filtrado.
- 6.6 g de sólidos/13.6 g de hoja (se consideró una pérdida del 2% del volumen total por la filtración en la tela).

En el CUADRO No. 2 se presentan los rendimientos de enzima para la papaína y para el extracto crudo obtenido de las hojas de Chaya. Los cálculos de unidades enzimáticas se basan en un contenido de proteínas del 71.66% y 7.24% en B.S. respectivamente

La relación en masa de materia prima encontrada para obtener la misma cantidad de unidades enzimáticas es de:

$$\frac{\text{Frutos del papayo } 180 \text{ (g)}}{\text{Hojas de Chaya } 2.85 \text{ (g)}} = 63.15$$

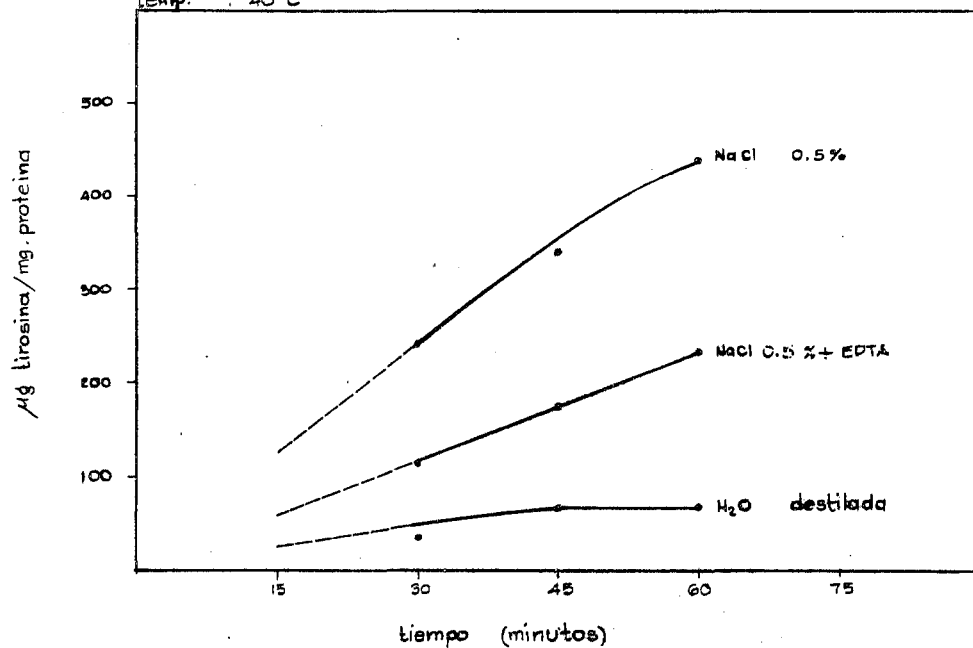
La relación de unidades enzimáticas para la papaína concentrada y el extracto crudo liofilizado es de:

$$\frac{2\ 258\ 723 \text{ (U)}}{66\ 846 \text{ (U)}} = 33.79$$

GRAF. No 2. ACTIVIDAD ENZIMATICA

EXTRACCIONES CON NaCl, pH: 6.0

sustrato: caseína 1%
pH : 6.0
temp. : 40°C

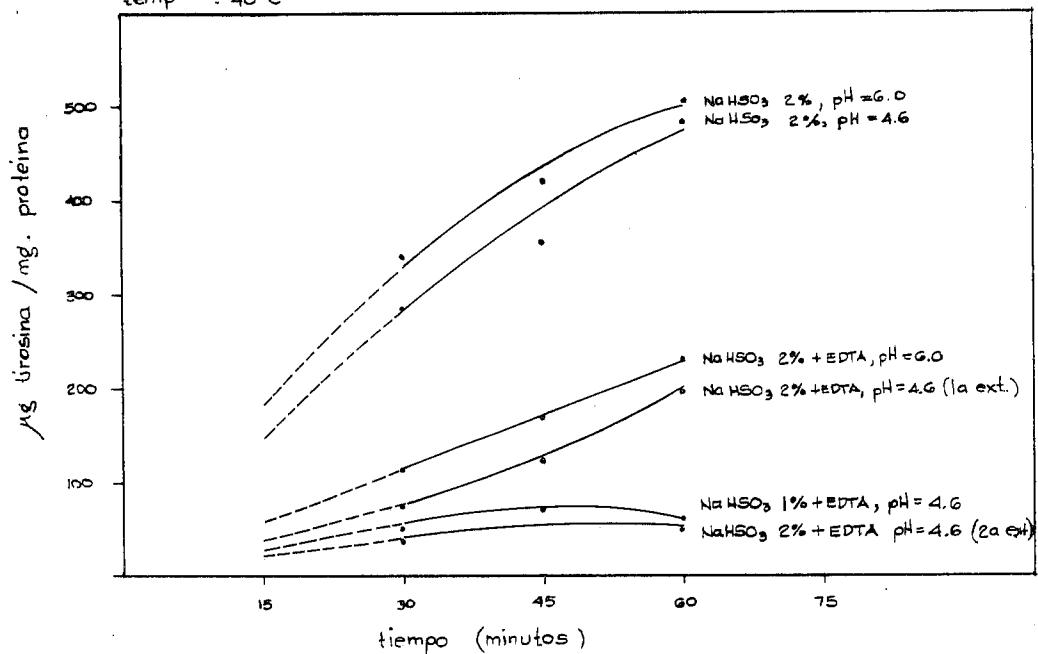


54

GRAF. No 3. ACTIVIDAD ENZIMATICA

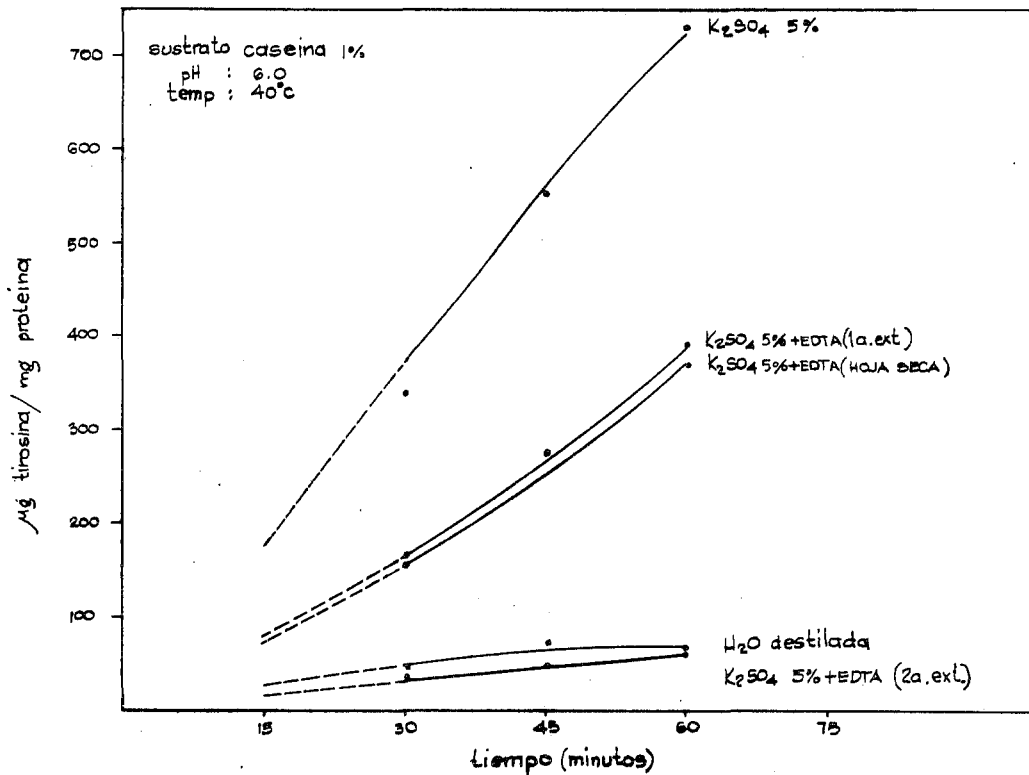
EXTRACCIONES CON NaHSO_3 .

sustrato: caseina 1%
pH : 6.0
temp : 40°C



GRAF. No 4 ACTIVIDAD ENZIMATICA. EXTRACCIONES

CON K_2SO_4 , pH = 6.0

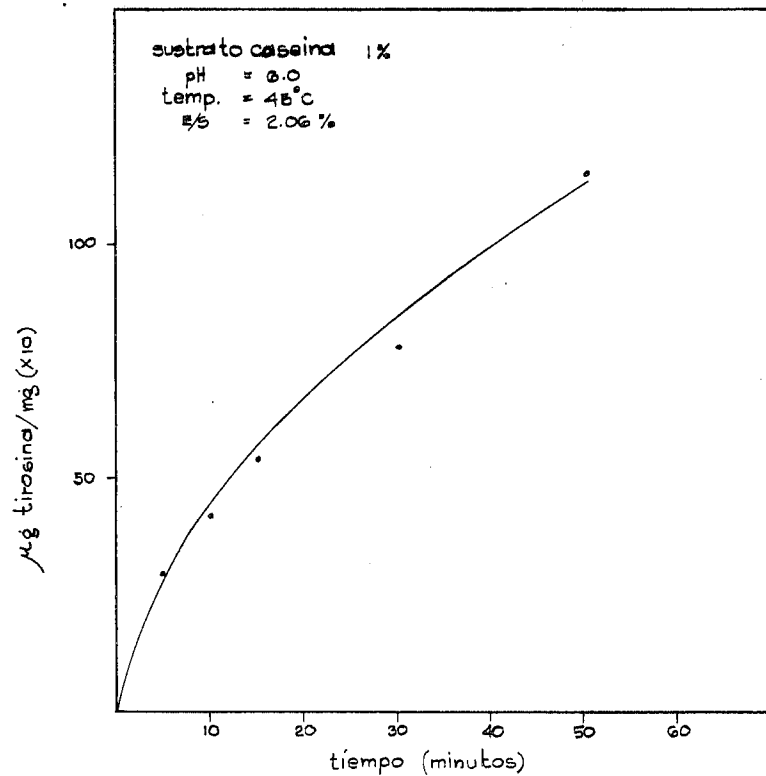


Handwritten signature or initials.

GRAF. No.5

ACTIVIDAD ENZIMATICA

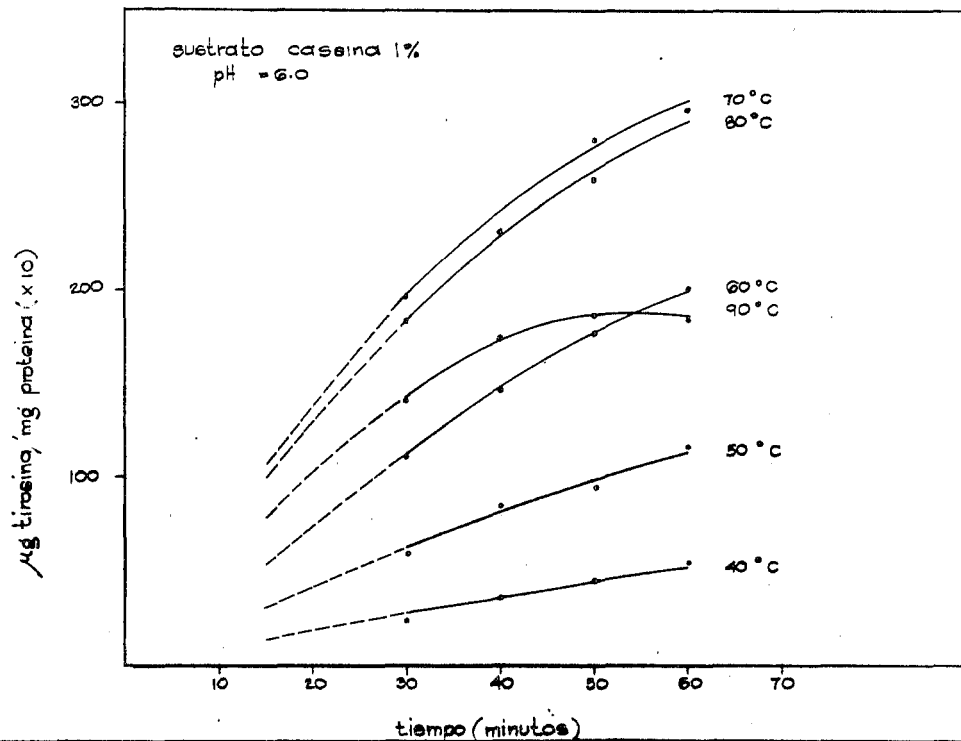
EXTRACCION CON K_2SO_4 5%, pH=6.0



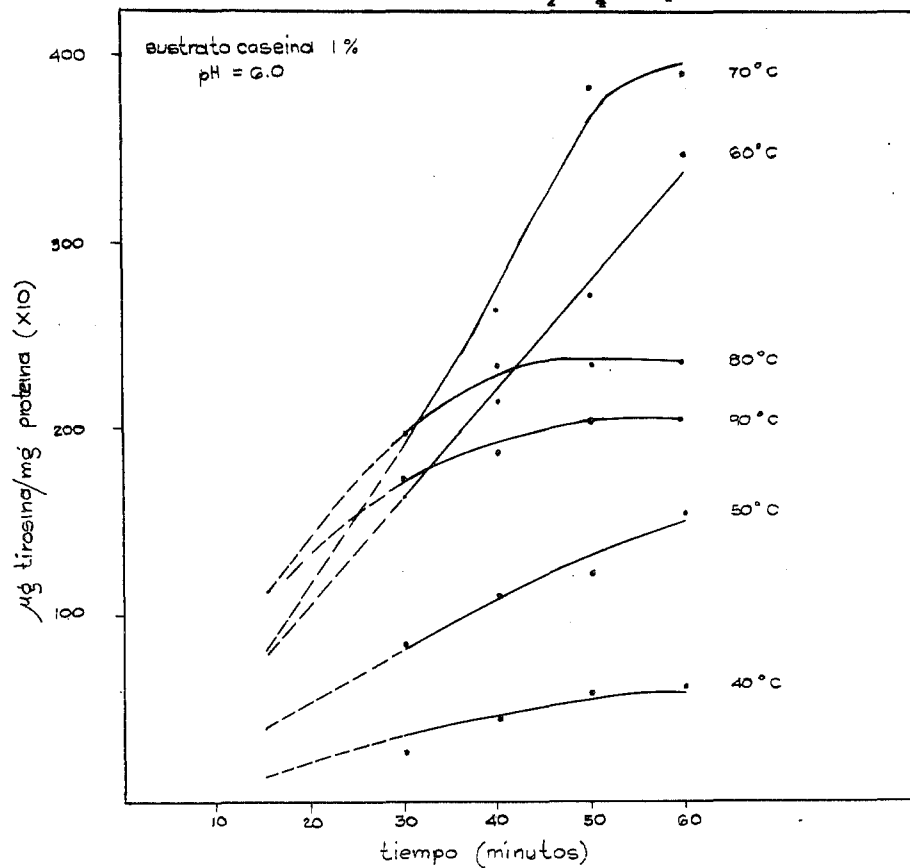
GRAF. No. 6

EFFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA
ACTIVIDAD ENZIMATICA

K_2SO_4 5% + EDTA, pH=6,0

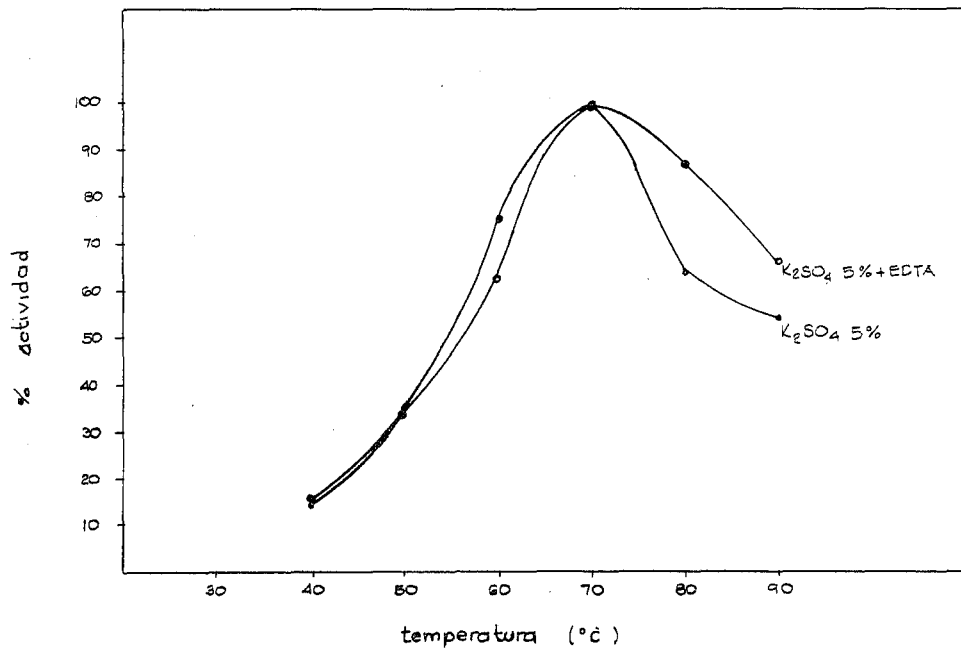


GRAF No 7. EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA ACTIVIDAD ENZIMATICA K_2SO_4 5%, pH=6.0



GRAF.No 8. EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA ACTIVIDAD
ENZIMATICA. TIEMPO DE HIDROLISIS: 50 min.

sustrato caseina 1%
pH = 6.0

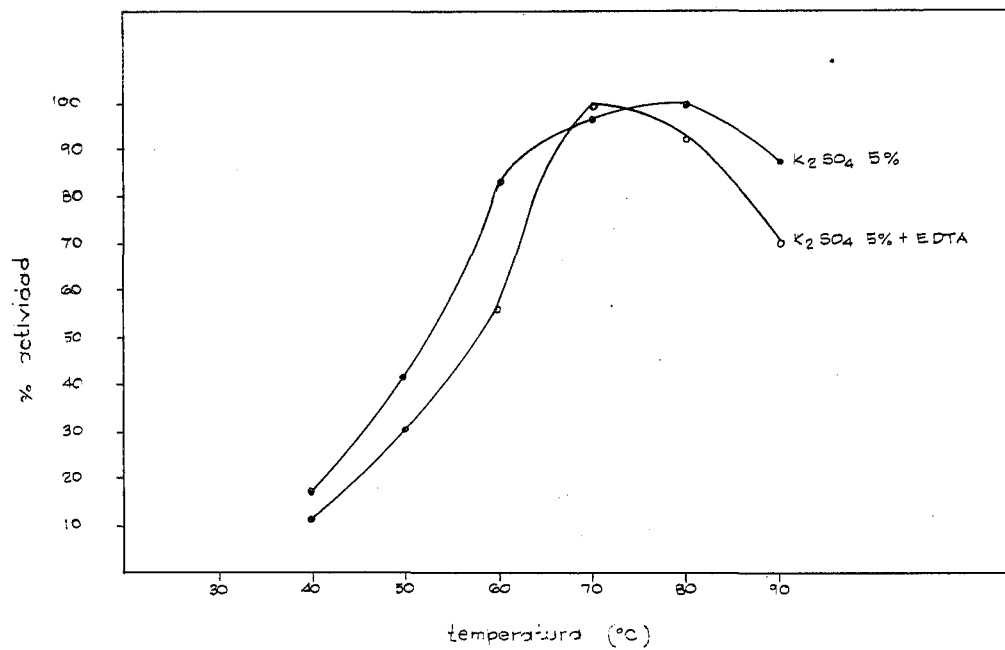


GRAF No. 9

EFFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA
ACTIVIDAD ENZIMATICA.

sustrato caseina 1%
pH = 6.0

TIEMPO DE HIDROLISIS 30 min



GRAF. 10. CURVAS DE ESTABILIDAD TERMICA

K_2SO_4 5% + EDTA, pH: 6.0

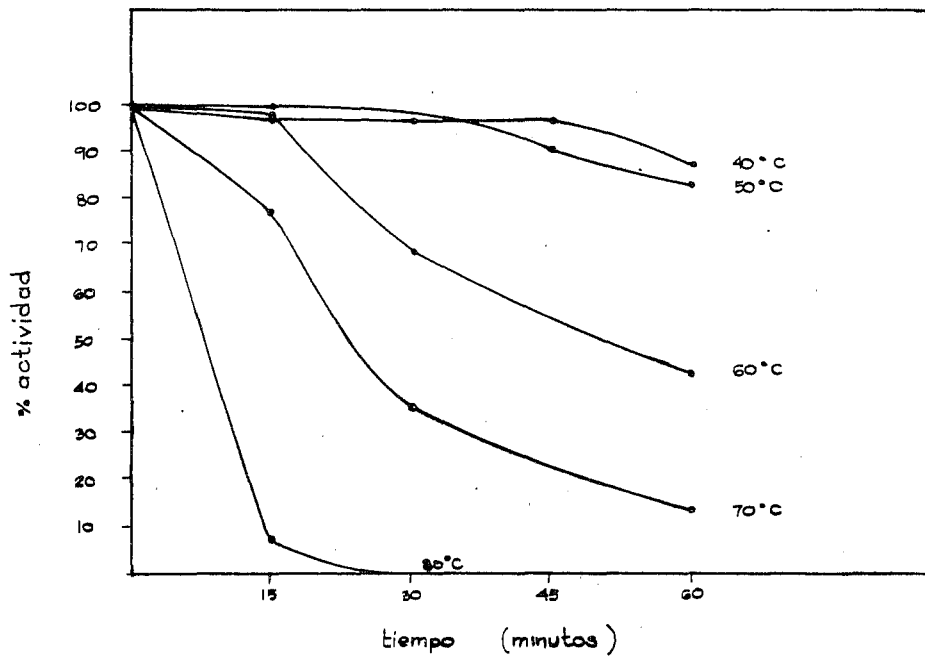
sustrato caseína 1%

temp. = 40°C

pH = 6.0

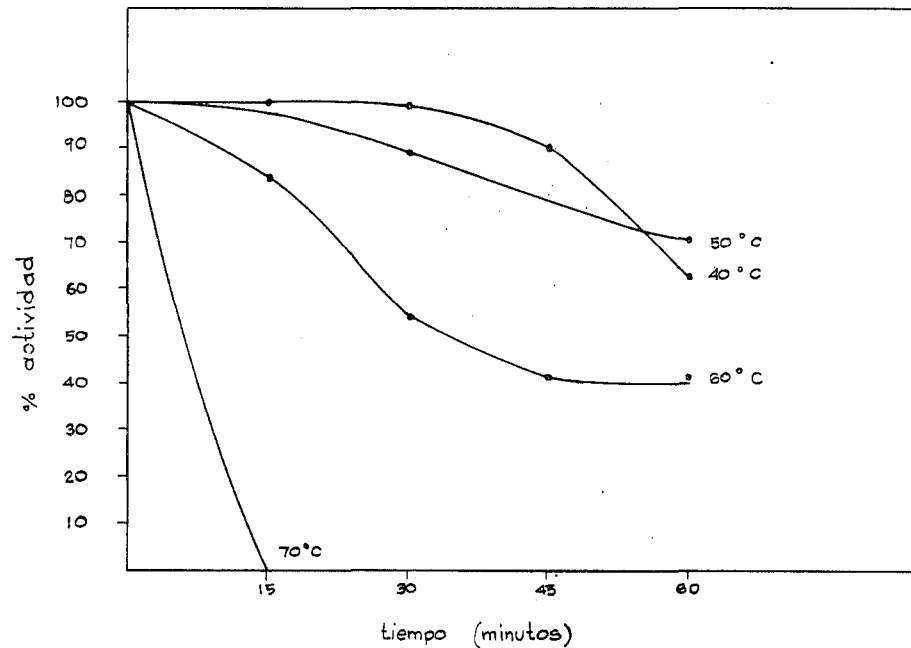
tiempo hidrolisis = 50'

m/s = 3.40 %



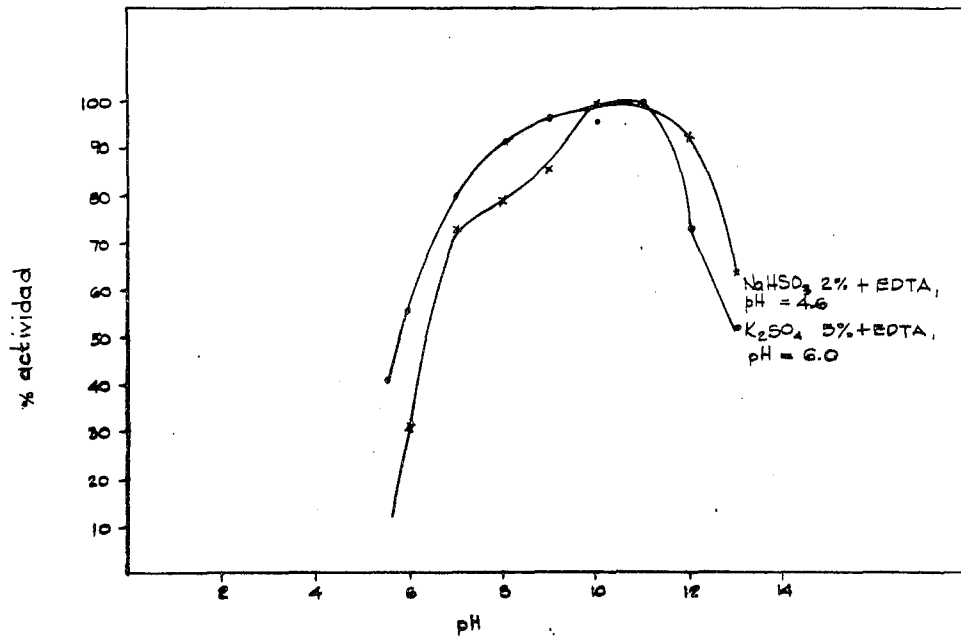
GRAF. No 11. CURVAS DE ESTABILIDAD TERMICA K_2SO_4 5%, pH:6.0

sustrato caseina 1%
temp. = 40°C
pH = 6.0
tiempo de hidrólisis 50'
E/S = 2%



GRAF. No 12. EFECTO DEL pH EN LA
ACTIVIDAD ENZIMATICA.

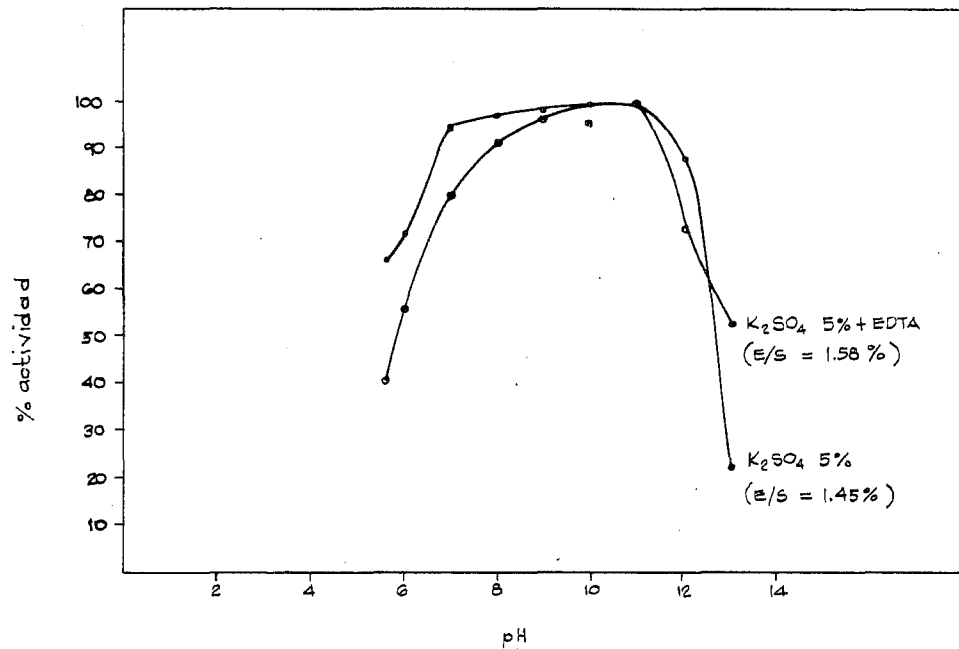
sustrato caseina 1%
temperatura 40°C
tiempo de hidrolisis 60 min.
NaHSO₃ 2% + EDTA, pH = 4.6 (EIS = 1.54 %)
K₂SO₄ 5% + EDTA, pH = 6.0 (EIS = 1.58 %)



Handwritten signature

GRAF. No 13 EFECTO DEL pH EN LA
ACTIVIDAD ENZIMÁTICA .

sustrato caseína 1%
temperatura 40°C
tiempo de hidrólisis 60 minutos



C U A D R O . 2

PAPAÍNA	ENZIMA CRUDA. CHAYA
<p>1 árbol = 30-40 frutos (180 Kg)</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>400 g de látex</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>60-80 g papaína cruda</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>40 g de papaína concentrada</p>	<p>84.4 g de hojas</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>40 g de sólidos (E.C.L.)</p>
<p>28.66 g de proteína</p>	<p>2.89 g de proteína</p>
<p>Act. específica = 78.8 <u>Unidades</u> mg prot</p>	<p>Act. específica = 23.13 <u>Unidades</u> mg prot</p>
<p>Unidades de act. enzimática: 2 258 723</p>	<p>Unidades de act. enzimática: 66 846</p>

APLICACION DEL EXTRACTO

CRUDO ENZIMATICO

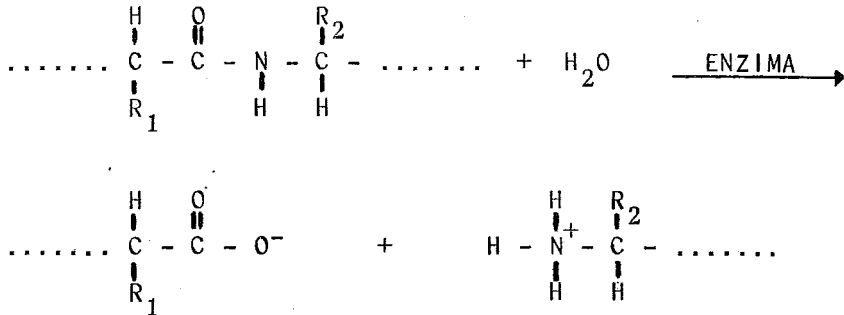
Las reacciones enzimáticas ocurren en condiciones - muy cercanas a las de los sistemas biológicos, por esto parecen ser adecuadas para la modificación de las proteínas de los alimentos, sin que se pierda su valor nutricional.

El uso potencial de la proteína de soya como ingrediente tanto en alimentos de bajo pH como en bebidas, depende del perfil de solubilidad del producto proteico. - La proteína de soya presenta una baja solubilidad en valores de pH entre 4 y 5, sin embargo la modificación enzimática de ésta permite su solubilidad en el punto isoeléctrico.

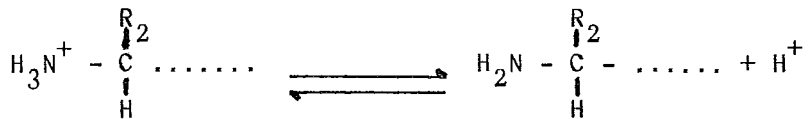
La aplicación efectuada con el extracto crudo obtenido de las hojas de Chaya se hizo con el fin de modificar, mediante una hidrólisis enzimática, la proteína de soya para su posterior adición a una bebida de bajo pH.

HIDROLISIS ENZIMATICA DE LAS PROTEINAS DE SOYA

Las proteasas (endo-peptidasas) atacan los enlaces peptídicos de las proteínas de acuerdo al siguiente esquema:



En valores de pH arriba de 6.5, la disociación del grupo amino es significativa.



(El valor de pK de los grupos alfa-amino en los polipéptidos es de 7-7.2 a 50 °C).

Para mantener el pH de la reacción, se requiere de la adición de una base en forma continua durante la hidrólisis.

Generalmente se recomienda utilizar NaOH 4 N.

Para muchas reacciones que ocurren en valores de pH neutros o alcalinos, se recomienda el uso del pH - stat- (28).

El pH es controlado mediante la adición de una base. Por la alta capacidad reguladora del sistema, el control de la reacción es simple y para fines industriales aún la titulación manual es suficiente.

GRADO DE HIDROLISIS

Adler-Nissen define el grado de hidrólisis (DH) de la siguiente manera:

$$DH = \frac{\text{Número de enlaces peptídicos rotos}}{\text{Número total de enlaces peptídicos}} \times 100$$

$$DH = \frac{h}{h_t} \times 100$$

El número total de enlaces peptídicos en una proteína (h_t) puede calcularse de la composición de aminoácidos. Para la mayoría de las proteínas de los alimentos se puede asumir un valor aproximado de 8 meq por gramo de proteína. (Calculado como N Kjeldahl x 6.25).

Existe una proporcionalidad entre el número de enlaces peptídicos rotos y el consumo de base, al mantener el pH constante durante la reacción. Del consumo de base (B) puede calcularse el grado de hidrólisis ---

(DH) de la siguiente relación:

$$DH = B \times \frac{1}{\alpha} \times \frac{N_B}{MP} \times \frac{1}{h_t} \times 100 \%$$

Donde:

B = consumo de base en ml

α = grado de disociación, definido como:

$$\alpha = \frac{10^{\text{pH}-\text{pK}}}{1 + 10^{\text{pH}-\text{pK}}}$$

N_B = normalidad de la base

MP = masa de proteína en g (N x 6.25)

h_t = número total de enlaces peptídicos en meq/g de --
proteína. Para la proteína de soya se puede uti-
lizar un valor aproximado de 8 meq/g.

CURVAS DE HIDROLISIS

Al graficar el valor de DH en función del tiempo, -
se obtienen las correspondientes curvas de hidrólisis -
cuyas formas varían dependiendo del sistema enzima-pro-
teína utilizado.

La velocidad de reacción disminuye con el tiempo y
a un valor determinado de DH se vuelve casi constante.

PRINCIPALES PARAMETROS DE LA HIDROLISIS

Para un determinado sistema enzima-proteína, deben

especificarse los siguientes parámetros:

S = concentración de sustrato calculado como % de proteína ($N \times 6.25$) de la materia prima.

E/S= relación protéica de enzima-sustrato en %.

pH y temperatura ($^{\circ}\text{C}$).

tiempo de hidrólisis.

Formación de péptidos amargos

La degradación excesiva de una proteína provoca la formación de péptidos amargos. Se ha observado que el amargor es más pronunciado a valores altos de DH, pudiéndose eliminar este problema completamente si se alcanza un valor de DH suficientemente bajo.

Fin de la hidrólisis

La reacción se termina a un valor de DH bien definido. Esto se logra fácilmente con un cambio de pH o -tratamiento térmico con el fin de inactivar la enzima.

PARTE EXPERIMENTAL

EQUIPO:

- Vasos de precipitados de 1 litro
- Agitador mecánico CAFRAMO tipo RZR2- 64, con velocidad variable.
- Termómetro

- Potenciómetro Beckman Modelo H-2
- Bureta
- Baño de agua de temperatura controlada
- Centrífuga Internacional Modelo HN

Preparación del equipo.-

- El baño de agua de temperatura controlada se ajusta a una temperatura de 1.5 a 2 °C por encima de la temperatura de trabajo.
- Calibración del potenciómetro
- La normalidad de la base se determina por cuadruplicado, titulando 20.0 ml de HCl 1.0 N. Debe determinarse con una precisión mayor del 0.2%.

CONDICIONES DE ENSAYO

1. Concentración de sustrato.- Se utilizó un valor constante del 6% de proteína para todas las determinaciones. Se ha observado que para un valor determinado de E/S el tiempo de hidrólisis necesario para alcanzar un cierto valor de DH, es casi independiente del sustrato en un rango del 6-12% de proteína (28).

Como sustrato se utilizó un aislado de proteína de soya proveniente de la Grain Processing Corporation.

(PRO-FAM S-646)

El análisis reportado para este aislado es el siguiente:

PROTEINAS (B.S.)	91 %
SOLIDOS	94 %
CENIZAS (B.S.)	5.5 %
EXTRACTO ETEREO (B.S.)	1.5 %

2. Concentración de enzima.- De acuerdo a los resultados presentados en el capítulo anterior, el extracto crudo que presentó mayor actividad proteolítica fue el correspondiente a una solución de K_2SO_4 5%, pH=6.0; por esta razón éste será el que se utilice para la hidrólisis de la proteína de soya.

La relación E/S se mantuvo constante para todas las determinaciones, siendo del 10.3%. Este valor es elevado debido a la baja actividad proteolítica del extracto crudo.

El extracto crudo enzimático se disolvió en la solución amortiguadora (fosfato-cisteína-versenato) empleada para la determinación de actividad proteolítica.

3. pH.- El extracto crudo utilizado presenta un pH de máxima actividad entre 7 y 11, siendo el óptimo de 11. En base a estos resultados se ajustó el sustrato protéico a un pH de 10.0 con la solución de NaOH 4 N- previamente titulada.

4. Temperatura.- La temperatura de trabajo se eligió en base a las curvas de termoestabilidad presentadas anteriormente. Se escogió una temperatura de 50 °C como la más adecuada, aunque también se trabajó a 45 y 65 °C, no obteniéndose resultados tan satisfactorios.
5. Tiempo de hidrólisis.- Varió para cada una de las determinaciones, siendo en promedio alrededor de 4 horas.

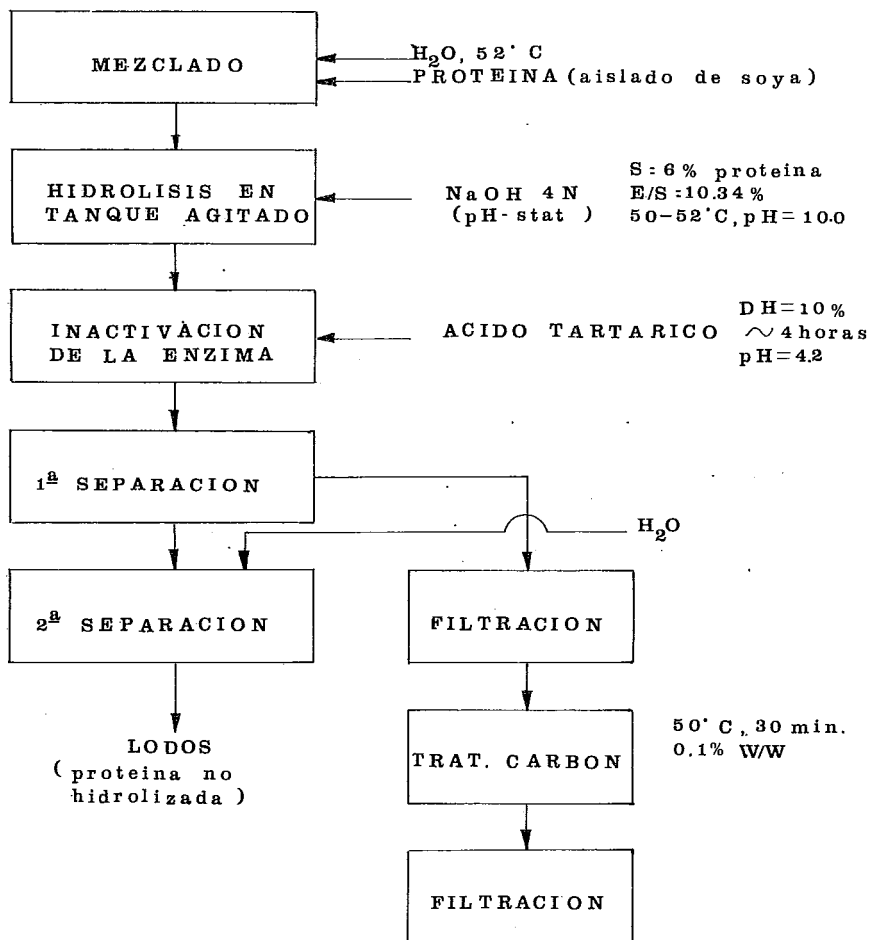
La hidrólisis enzimática se llevó al cabo de acuerdo al diagrama presentado en la Fig No. 2 .

Observaciones:

El mezclado se realizó en un recipiente de vidrio. - A nivel industrial se recomienda el uso de tanques de acero inoxidable con una agitación adecuada y provistos de bafles. El recipiente o tanque para la hidrólisis está equipado con un electrodo y una unidad de titulación para la adición de NaOH. En este caso se utilizó una bureta, siendo la titulación en forma manual.

Después de mezclar perfectamente la proteína con el agua, el pH se ajustó a 10.0 con NaOH 4 N y la enzima se adicionó en forma líquida (tiempo = cero). Desde este momento se controló la reacción manteniendo el pH constante. Cuando se llega al valor de DH fijado, se da fin a -

FIG. 2 OBTENCIÓN DE UN HIDROLIZADO DE
PROTEINA DE SOYA.



la hidrólisis con la adición de un ácido de grado alimenticio hasta llegar a un valor de $\text{pH}=4.2$. Se utilizó ácido tartárico 4 M, ya que presenta un sabor compatible con las bebidas de sabor uva. Entre otros ácidos que pueden utilizarse están: el fosfórico, cítrico y málico.

Posteriormente el hidrolizado se mantiene a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 60 minutos antes de la centrifugación, para asegurar la completa inactivación de la enzima.

La separación del hidrolizado del lodo residual, se lleva al cabo en una centrífuga. Con el fin de incrementar el rendimiento de proteína, los lodos se resuspenden en agua y se centrifugan. Los sobrenadantes se filtran y se tratan con carbón activado a $\text{pH}=5.0$. El hidrolizado filtrado se puede utilizar como tal en formulaciones de bebidas de pH bajo. Puede ser concentrado por evaporación o bien secado por aspersión.

RESULTADOS

Las condiciones en las cuales se obtuvo una mayor solubilidad de las proteínas fueron las siguientes:

M_t = masa total de la mezcla de reacción: 400 g

$S\%$ = 6.0

E/S = 10.3%

E/M_t = 0.75%

pH = 10.0

Temperatura = $50\text{ }^{\circ}\text{C}$

Tiempo de hidrólisis = 4 horas

Para los cálculos de DH se utilizaron los siguientes valores:

- $h_t = 7.75 \text{ meq/g (} N \times f_n \text{)}$. (Basado en análisis desarrollados en el Proteinkemisk Institut, Horsholm, Denmark y en Bioteknisk Institut, Kolding, Denmark)
- $f_n = 6.25$ (38).
- $\alpha_n^{-1} = 1.0$ (pH=10, temperatura = 50 °C)

Se ha observado que este valor depende en pequeña proporción del tipo de material protéico, pero no de la enzima utilizada.

- $pK = 7.1$ (50 °C)
- $N_B = \text{normalidad de NaOH} = 4.10885$

COMIENZO DE LA HIDROLISIS

pH inicial de la mezcla de reacción = 6.3

Volúmen de NaOH adicionada = 3.6 ml

Volúmen total de la mezcla de reacción = 410 ml

Temperatura inicial = 50 °C

TABLA DE RESULTADOS DURANTE LA HIDROLISIS

TIEMPO (min)	VOLUMEN NaOH (ml)	DH %
30	3.15	6.9
60	3.6	7.95
90	3.8	8.39

TIEMPO (min)	VOLUMEN NaOH (ml)	DH %
120	4.3	9.49
150	4.9	10.82
180	5.4	11.93
210	5.7	12.59
240	6.2	13.69

TERMINACION DE LA HIDROLISIS

pH final = 4.2 (ácido tartárico 4 M, 8.0 ml)

Temperatura final = 49.9 °C

PRODUCTO OBTENIDO

1.- Hidrolizado de la 1a. centrifugación:

Densidad (20 °C) = 1.0182 g/ml

Proteínas solubles: 25.85%

2.- Hidrolizado de la 2da. centrifugación:

Densidad (20 °C) = 1.0053 g/ml

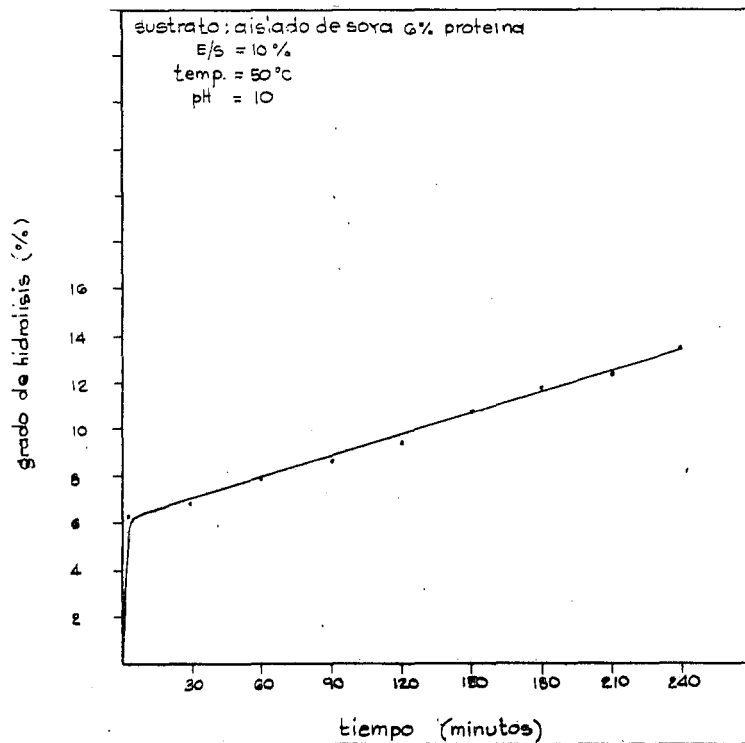
Proteínas solubles = 20.15%

En el GRAFICO No. 14 se presenta la curva de hidrolisis correspondiente al sistema enzima-sustrato utilizado.

Observaciones:

El rendimiento de proteína soluble es bajo debido posiblemente a:

GRAF. No 14. HIDROLISIS ENZIMATICA DE LAS PROTEINAS
DE SOYA .



- 1) La baja especificidad de la enzima por el sustrato.
- 2) La hidrólisis limitada de las proteínas de soya por esta enzima.
- 3) La baja relación E/S utilizada.

Recomendaciones:

1. Efectuar la hidrólisis a tiempos más prolongados para lograr una mayor solubilidad de la proteína.
2. Encontrar la relación óptima de E/S para el sistema estudiado.
3. Utilizar como sustrato un aislado de mayor solubilidad.
4. Realizar lavados adicionales con el lodo residual, es decir redisolverlo en agua y centrifugarlo varias veces.
5. Llevar al cabo una segunda hidrólisis enzimática sobre el lodo residual de los lavados. Se ha observado que los rendimientos en los hidrolizados de soya pueden incrementarse de un 65% después de una 4ta centrifugación, hasta cerca del 80% al realizarse una segunda hidrólisis (31).
6. Se podría sugerir un tratamiento previo a la hidrólisis enzimática con H_2SO_4 diluido a 105 °C y pH=3.0 -- por 15 minutos (39). Durante este pretratamiento la proteína es desnaturalizada y parcialmente hidrolizada. Se ha observado que para la subsecuente hidrólisis enzimática, se obtienen mayores rendimientos y me

por sabor del hidrolizado comparado con aquellos donde el material protéico no ha sido previamente tratado.

FORTIFICACION DE UN JUGO COMERCIAL

El hidrolizado obtenido fue adicionado a un jugo de uva comercial, con el fin de obtener una bebida con 1.5% de proteína.

Se disolvieron 5.80 gramos del hidrolizado (liofilizado- 1a. centrifugación) a 100 ml de jugo, posteriormente se realizó un análisis organoléptico para determinar la aceptabilidad de esta bebida, en comparación con la original.

Se evaluaron los siguientes parámetros: sabor, color, aroma y apariencia de las bebidas (con y sin hidrolizado).

Se escogió una escala hedónica de 10, donde:

10 = muy bueno

9-7= bueno

6-4= regular

3-1= malo

Las evaluaciones fueron hechas por un grupo de 6 panelistas. Los resultados se analizaron estadísticamente utilizando el método de varianza. (Kramer and Ditman, --- 1956) (42). Se determinaron las medias (\bar{x}) y desviaciones típicas de las calificaciones obtenidas.

RESULTADOS

pH del jugo comercial = 3.5

	Jugo natural	Jugo + hidrolizado
SABOR	8.16 ± 0.41	5.66 ± 1.36
COLOR	9.0 ± 1.09	6.66 ± 1.63
AROMA	8.33 ± 1.51	6.5 ± 1.76
APARIENCIA	8.66 ± 1.75	7.33 ± 1.21

- 1) En relación al sabor y el color las muestras presentaron diferencias significativas al 1%.
- 2) En el aroma y la apariencia las muestras presentaron diferencias significativas al 5%.
- 3) Entre los panelistas no se obtuvieron diferencias significativas.

Observaciones.-

Las diferencias en el sabor, se deben principalmente a la cantidad de hidrolizado adicionado, así como al alto nivel de ácido orgánico presente en el mismo.

Debe encontrarse la relación más adecuada entre la cantidad de hidrolizado y edulcorante, para obtener una bebida de mayor aceptabilidad. Esto significa la elaboración de una formulación para un tipo especial de bebida fortificada de sabor agradable.

El hidrolizado protéico proporciona a la bebida mayor "cuerpo". Esta propiedad podría utilizarse en bebidas de bajo contenido de azúcar, las cuales generalmente no lo presentan. Para este propósito podrían ser utilizadas menores concentraciones de hidrolizado.

CONCLUSIONES

1. Se comprobó la presencia de proteasas sulfhidrílicas en los extractos obtenidos de las hojas de Chaya, al determinar su actividad enzimática en un strato de caseína.
2. La solución más eficiente para la extracción de estas proteasas fue la de K_2SO_4 5%, pH=6.0, obteniéndose la máxima actividad enzimática por mg de proteína extraída.

3. La presencia de EDTA en los extractos confieren a la enzima una mayor estabilidad térmica. Es recomendable encontrar la concentración óptima de versenato en la solución de extracción para obtener la mayor actividad específica y estabilidad térmica.
4. La actividad enzimática no se afecta por el secado de las hojas de Chaya a 50 ± 3 .°C antes del proceso de extracción ni por la liofilización del extracto crudo.
5. Es factible el aprovechamiento de las hojas como alimento después de la extracción debido al contenido protéico remanente (18% B.S.).

6. Las enzimas extraídas con la solución más eficiente, al determinarse su actividad enzimática sobre un sustrato de caseína, presentaron las siguientes propiedades:

Temperatura óptima = 70 °C (50').

Tiempo de vida media = 35 minutos a 60 °C.

pH óptimo = 7-11.

Agente activador de la enzima: cisteína.HCl.

En comparación con otras proteasas vegetales presentan un pH óptimo muy alcalino y una estabilidad térmica moderada, siendo menos termoestables que la papaína ($t_{\frac{1}{2}} = 56.0$ min a 75 °C) y más estables que la bromelina ($t_{\frac{1}{2}} = 21.5$ min a 60 °C).

La temperatura óptima es inferior a la observada para la papaína (83 °C), siendo la desnaturación de las proteasas de la Chaya muy rápida - arriba de los 70 °C.

7. Es necesario realizar determinaciones de estabilidad de la enzima a diferentes valores de pH para poder establecer mejores condiciones de extracción, almacenamiento y aplicación de la misma.
8. Es recomendable emplear otros sustratos proteicos como son la gelatina y la hemoglobina, con el fin de establecer las diferencias entre esta enzima y otras proteasas desde el punto de vista de su especificidad. La hemoglobina permite trabajar en un-

rango mayor de pH, por lo que sería de gran utilidad para observar el comportamiento de la enzima a pH's ácidos (menores a 4.5).

9. Es necesario efectuar un estudio cinético para determinar la influencia de parámetros tales como la concentración de enzima; de sustrato y de activador en la velocidad de reacción.
10. La papaína concentrada comercial es 3.4 veces más activa que las proteasas extraídas de las hojas de Chaya en las condiciones antes reportadas. Debido a la baja actividad específica del extracto crudo-obtenido es recomendable encontrar métodos de purificación apropiados, tomando en cuenta los rendimientos y costos que esto implique.
11. Se observaron diferencias de la actividad enzimática en distintos lotes de hojas, por lo que es recomendable efectuar estudios sobre el efecto de parámetros tales como las condiciones de cultivo, la edad y la zona geográfica sobre el desarrollo de la actividad proteolítica.
12. La relación en masa de materia prima encontrada para obtener la misma cantidad de unidades enzimáticas, según se observa en el CUADRO 2 es de:

$$\frac{\text{Frutos del papayo (g)}}{\text{Hojas de Chaya (g)}} = 63.15$$

Este valor justificaría la posible industrialización de las hojas de Chaya.

13. Las proteasas extraídas de las hojas de Chaya se probaron sobre un sustrato de proteína de soya con el fin de modificarlo enzimáticamente y obtener proteína soluble en el punto isoeléctrico.

Se obtuvo un 46% de proteína soluble al emplearse un 6% de proteína de soya como sustrato, una relación E/S de 10.3%, pH=10.0 y temperatura de 50 °C, para un tiempo de hidrólisis de 4 horas.

La proteólisis limitada sobre la proteína de soya no produjo formación de péptidos amargos.

14. Para el sistema enzima-sustrato utilizado se requiere encontrar la combinación adecuada de concentración de sustrato, relación de E/S y temperatura que optimicen la producción del hidrolizado.
15. Los hidrolizados de proteína de soya deben considerarse como ingrediente importante, al igual que el edulcorante, para elaborar bebidas de bajo pH fortificadas con proteínas.
16. Con base en la cantidad de hidrolizado de soya requerida para la fortificación nutricional de una bebida o jugo de bajo pH, es necesario desarrollar formulaciones para un nuevo tipo de producto.
17. Dado que México es el país que consume más refrescos por habitante, la fortificación de éstos con proteínas modificadas enzimáticamente puede considerarse como una alternativa que contribuya a mejorar la dieta de la población.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Cyrus Longworth Lundell. "The Genus Cnidoscolus in Mexico: new species and critical notes". Bulletin of the Torrey Botanical Club. 72 (3). p. 319-322, ---- 1945.
- (2) Galomo Rangel Tomás. "Estudio morfológico de la Chaya" (Cnidoscólus chayamansa, Mc. Vaugh). Colegio Superior de Agricultura tropical. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. 1978.
- (3) Díaz Bolio José. "Una planta maravillosa alimenticia y medicinal". Crónica etnobotánica. Mérida, Yucatan. 1974.
- (4) Munsell, H. E., Williams, O., Guild, L.P., Troesch, C. B., Nightingale, G., and Harris, R. "Edible ----- plants of Central America". Part I. Food Res. 14: - 144-164, 1949.
- (5) Martin W. Franklin and Ruberté Ruth. "Vegetables for the Hot, Humid Tropics". Part 3. Chaya, Cnidoscolus chayamansa. Science and Education Administration --- U.S. Department of Agriculture. New Orleans, La. --- 70153. 1978.
- (6) Dr. Cravioto. O. René, Massieu H. G., Guzmán García - J. y Calvo de la Torre José. "Valor Nutritivo de --- plantas alimenticias de Yucatán". Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana. Vol XXXII, p. 328, 1952.

- (7) Martin W. Franklin, Telek Lehel y Ruberté Ruth. "Some Tropical Leaves as Feasible Sources of Dietary Protein". *Journal Agriculture University of Puerto Rico (JAUPA)*. 61 (1). p. 32-40, 1977.
- (8) Nagy Steven, Nordby E. Harold and Telek Lehel. "Lipid Distributions in Green Leaf Protein Concentrates from four tropical leaves". *J. Agric. Food Chem.* 26 (3). p. 701-706, 1978.
- (9) Caygill J. C. "Sulphydryl Plant Proteases". *Enzyme Microb. Technol.* Vol I (October). p. 233, 1979.
- (10) Balcázar Padilla Ma. del Refugio. "Estudio comparativo entre la mexicaína y la papaína en preparaciones purificadas y cristalinas". TESIS PROF. IPN.-- Esc. Sup. Ciencias Biol. 1945.
- (11) M. Castañeda-Agullo, Huerta L, Hernández A y Salazar V. "Evolución de la actividad proteolítica del látex (mexicaína) durante el desarrollo del fruto del cuaguayote (*Pileus mexicanus*)". *Anales de la Esc. Nac. de Ciencias Biológicas*. Vol V, 1948.
- (12) Toro Goyco Efraín, Marezki A y Matos L. Milton. "Isolation, Purification, and Partial Characterization of Pinguinain, The Proteolytic Enzyme from *Bromelia pinguin* L". *Archives of Biochemistry and Biophysics* 126. p. 91-104, 1968.
- (13) Winnick, Davis and Greenberg. *Journal Gen. Physiol*, 23 p. 275, 289, 301. 1940.
- (14) Skelton, G. S. *Phytochemistry*. 8. p. 57, 1969.
- (15) Sidney P. Colowick and Nathan O. Kaplan. *Methods in Enzymology*. Vol II (a), Vol XIX (b), Vol XLV (c).-- Academic Press, Inc., Pub. New York. p. 55-64 (a), 264-274 (b), p. 3-9 (c), 1955.

- (16) ✓ Anson M.L. J. Gen Physiol. 22, 79, 1938.
- (17) ✓ Kunitz M. Journal Gen Physiol 30, 291, 1947.
- (18) ✓ O.H. Lowry, N. J. Rosenbrough, A.L. Farr, and R. J. Randall. J. Biol. Chem. 193, 265, 1951.
- (19) ✓ Fels Gordon and Veatch Roger. "Microdetermination of Ammonium and Protein Nitrogen". Anal. Chem. 31-p. 451-452, 1959.
- (20) Whitaker John R. Food Related Enzymes. Advances in Chemistry Series 136. Am. Chem. Soc. Wash, D.C. -- U.S.A., 1974.
- (21) Witt. Paul R. Jr., Sair R. A., Richardson T and Olsson N. F. "Chillproofing beer with insoluble papain". The Brewers Digest. 45 (10) p. 72-79, 1970.
- (22) González López Francisco Javier. "Estudio práctico sobre el efecto de algunos estabilizadores en cerveza". TESIS. UNAM. 1974.
- (23) Weiner Shirley, Mangel Margaret, Maharg Leta and -- Kelley G. G. "Effectiveness of Commercial Papain in Meat Tenderization". Food Technology. May p. --- 248-252, 1958.
- (24) Pattie P. Hay, Dorothy L. Harrison, and Gladys E. - Vail. "Effect of a Meat Tenderizer on Less Tender-Cuts of Beef Cooked by four Methods". Food Technology. May. p. 217-220, 1953.
- (25) ✓ Whitaker John R. "Properties of the Milk-Clotting-Activity of Ficin". Food Technology. Feb p. ----- 86-91, 1959.

- (26) Gupta C. B. and Eskin N. A. M. "Potencial use of- Vegetable Rennet in the production of cheese". -- Food Technology. May. p. 62-66. 1977.
- (27) Reed Gerald. Enzymes in Food Processing. Food - Science and Technology. A. Series of Monographs. Academic Press. New York. 1966.
- (28) Adler-Nissen J. "Enzymatic Hydrolysis of Food -- Proteins". Process Biochemistry. 6 (12) p. ---- 18-32, 1977.
- (29) Enzymes use and control in Foods. Institute of - Food Technologists. Short Course. 1976.
- (30) Cole. E. R. "Alternative Methods to the Kjeldahl estimation of Protein Nitrogen". The Royal Aus-- tralian Chemical Institute Rev, Pure, and Appl. - Chem. 19, 109, 1969.
- (31) Sejr Olsen, H., Adler-Nissen, J., Jensen, H. J., - and Moller, O. "Enzymatic Hidrolysis of Soy Pro- teins. Processing Developments and Applications - in Low pH foods". Presented at Fifth Internatio- nal Congress of Food Science and Technology, Kyo- to, Japan, 1978.
- (32) Ney, K. H. Z. Lebenson. Unters. Forsch 147, 64 -- (1971/72).
- (33) "Official and Tentative Methods of Analysis of -- The Association of Official Agricultural Chemists" Sixth Edition, AOAC, Wash, 1945.
- (34) Methods in Enzymology. Vol XXII. "Enzyme purifi- cation and related techniques". Edited by Wi---- lliam B. Jakiby. Academic Press, Inc. p. 33-39,- 1971.

- (35) Witt Paul R, Jr., Toussignant Edward A. "Proteolytic activity based on a Malt Flour Substrate-Interaction". Cereal Chemistry. 44 (4) p. 403-410, 1967.
- (36) Normas de Identidad y de pureza para algunas enzimas y otras diversas sustancias. FAO, 1973.
- (37) Helbig N. B., Ho. L., Christy G. E., and Nakai. S. "Debittering of skim milk hydrolysates by adsorption for incorporation into acidic beverages". Journal of Food Science. 45 (2) p. 331-335, 1980.
- (38) Smith, A. K., Circle, S. J. Soybeans: Chemistry and Technology. Vol I. PROTEINS. AVI Publishing. Westport, Conn. p. 62-63, 1972.
- (39) Adler-Nissen Jens. "Enzymatic Hydrolysis of Proteins for Increased Solubility". J. Agric. Food Chem. 24 (6) p. 1090-1093, 1976.
- (40) Sejr Olsen H and Adler-Nissen J. "Industrial Production and Applications of a Soluble Enzymatic Hydrolyzate of Soya Protein". Process Biochemistry. 13 (7), 1979.
- (41) Nord F. F. "Advances in Enzymology and related Subjects of Biochemistry". Vol XIV. Interscience Publishers, Inc. New York. p. 375-399, 1953.
- (42) Kramer A., Twigg Bernard A. Fundamentals of Quality Control for the Food Industry. AVI Publishing. Westport, Conn. p 137-140, 487-496, 1966.