



ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA Y AGROINDUSTRIA

ESTUDIO DE LA VARIACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA PROTEOLÍTICA DEL LÁTEX DEL BABACO (*Vasconcellea heilbornii* cv babaco) EN FUNCIÓN DE LA EDAD DEL FRUTO

PROYECTO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERO
QUÍMICO

RODRIGO MAURICIO ACOSTA JAYA

acostarod@yahoo.com

Directora: JENNY RUALES, Ph.D.

jenny.ruales@epn.edu.ec

Quito, Junio 2011

© Escuela Politécnica Nacional 2011

Reservados todos los derechos de reproducción

DECLARACIÓN

Yo, Rodrigo Mauricio Acosta Jaya, declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Escuela Politécnica Nacional puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido con la Ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y por la normativa vigente.

Rodrigo Mauricio Acosta Jaya

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue desarrollado por Rodrigo Mauricio Acosta Jaya, bajo mi supervisión.

Jenny Ruales, PhD.

DIRECTORA DEL PROYECTO

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Ciencia de los Alimentos y Biotecnología de la Escuela Politécnica Nacional y financiado por el Programa de Mejoramiento de los Servicios Agrícolas (PROMSA) Proyecto AQ-CV-010 y del Internacional Program in Chemical Sciences EC:01 de la Universidad de Uppsala, Suecia.

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA

A todo el personal humano del Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Escuela Politécnica Nacional (DECAB).

A la Dra. Jenny Ruales, por su ayuda y acertada dirección en este proyecto sin escatimar esfuerzos ha logrado darme tantas ideas y nuevas formas de ver mi vida, pensar en desarrollar más nuestro bello país.

A Juan, Mayra, Edwin, Lorena, Carlota, Elena, con los cuales día a día trabajamos en los proyectos en el DECAB gracias por su valiosa amistad y apoyo.

A mi Papa Julio Alberto que siempre ha estado conmigo en mi mente y corazón, será por su gusto a la montaña que he logrado subir todas las montañas de nuestro país e inclusive hacer mis propias rutas.

A mi mama María Magdalena que siempre ha tratado de que termine lo que emprendo y aunque a veces me he sentido molesto por esa presión, se que todo lo hace por su inmenso amor.

A mis hermanos que los tengo conmigo en mi corazón y con los cuales he vivido una niñez increíble y por ellos he podido aprender más rápido las cosas. Ellos han aportado en mis muchos deseos y ganas de superación.

A mis amigos del Club de Andinismo de la Poli, que fueron con los que comencé a mejorar mis condiciones de andinista.

A mi amigo Rafael Martínez quien logró convertirme en un escalador de grandes paredes y guía profesional de alta montaña mi segunda profesión que la he ejercido con mucho entusiasmo, y su familia con la cual he pasado momentos increíbles a tal punto que en momentos han sido casi como mi propia familia.

A Nico Miranda mi compañero de aventuras y competencias extremas con el cual logre hacer una ruta mixta de 800 m, cuya dificultad es MD+ en el Antisana Sur llamada "Nuevo Amanecer".

A Geovanny, Gogol, Lucho, Romel, Willian amigos con los cuales he compartido muchos momentos de vida que son muy importantes para mí.

A los señores Decano, Subdecano, Profesores, Sra. Charito y demás personas que conforman la Facultad donde se he vivido tantas alegrías, miedos, las mismas que me han apoyado para terminar con mi titulación estando aún en el exterior.

A mi familia Alemana que aunque siendo de otro país muy diferente me han dado mucho amor y confianza para poder sentirme bien estando lejos de mi gente, cada uno de ellos han podido de una u otra manera darme fuerzas para seguir con mis ideas.

DEDICATORIA

Este trabajo va dedicado a mi propia Familia SISSI, MAX y LISA que son la parte más importante de mi vida actual y por los cuales no he desmayado en culminar con mi Titulación Universitaria sin importar lo tan difícil que ha sido estar lejos sin ellos.

La fortuna que tienen las personas de conocer a otras es invaluable e indescriptible como en mi caso lo ha sido tener conmigo a LUCY quien estando tan lejos me ha brindado su ayuda de una manera impagable.

A todo aquella persona que aunque teniendo un camino desconocido por recorrer para alcanzar sus metas propuestas, no desmaya en sus intentos por llegar a donde muchas personas le dicen que es imposible.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	PÁGINA
RESUMEN	ix
INTRODUCCIÓN	xii
1. PARTE TEÓRICA	1
1.1 BABACO	1
1.1.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA	1
1.1.1.1 Especies relacionadas	2
1.1.1.2 Afinidades distantes	2
1.1.2 DESCRIPCIÓN DE LA PLANTA	2
1.1.2.1 Sistema radicular	3
1.1.2.2 Tronco	3
1.1.2.3 Hojas	4
1.1.2.4 Flores	4
1.1.2.5 Fruto	5
1.1.2.6 Reproducción	8
1.1.2.7 Variedades	8
1.1.2.8 Cosecha	8
1.1.3 COMPOSICIÓN DEL BABACO	9
1.2 ENZIMAS PROTEOLÍTICAS	9
1.2.1. ASPECTOS GENERALES DE LAS ENZIMAS	9
1.2.2. COFACTORES Y COENZIMAS	10
1.2.3. PROPIEDADES DE LAS ENZIMAS	10
1.2.3.1. Especificidad de las enzimas	10
1.2.3.2. La actividad catalítica	11
1.2.4. CLASIFICACIÓN Y NOMENCLATURA DE LAS ENZIMAS	12
1.2.5. HIDROLASAS	13
1.2.5.1. Proteasas	13
1.2.5.2. Proteinasas	13
1.2.6. ASPECTOS GENERALES ENZIMAS PROTEOLÍTICAS	14
1.2.7. PROPIEDADES DE LAS PROTEINASAS	16
1.2.7.1. Descripción de las proteasas	17
1.2.7.2. Codificación de las proteasas	17
1.2.7.3. Cisteíno proteinasas	17
1.2.8. APLICACIÓN DE LAS PROTEASAS	18
1.3 LÁTEX Y OBTENCIÓN	19
1.3.1. PRINCIPIO DE DESHIDRATACIÓN POR LIOFILIZACIÓN	21
2. PARTE EXPERIMENTAL	22
2.1 MATERIA PRIMA	22
2.2 OBTENCIÓN DEL LÁTEX	23

2.2.1. DETERMINACIÓN DE LA EDAD DEL FRUTO	23
2.2.2. EXTRACCIÓN DEL LÁTEX FRESCO	24
2.3 CARACTERIZACIÓN DEL LÁTEX	25
2.3.1. MEDICIÓN DE PH	25
2.3.2. MEDICIÓN DE DENSIDAD	26
2.3.3. MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE AGUA	26
2.3.4. MEDICIÓN DEL CONTENIDO DE SÓLIDOS SOLUBLES	26
2.3.5. MEDICIÓN DEL CONTENIDO DE HUMEDAD	26
2.3.6. MEDICIÓN DEL CONTENIDO DE PROTEÍNAS	27
2.3.7. MEDICIÓN DEL CONTENIDO DE ÁCIDOS ORGÁNICOS	29
2.3.7.1. Equipos, Reactivos y materiales	29
2.3.7.2. Preparación de la fase móvil	31
2.3.7.3. Preparación de los estándares	31
2.3.8. MEDICIÓN DEL CONTENIDO DE AZÚCARES	31
2.3.8.1. Materiales y reactivos	31
2.3.8.2. Preparación de la fase móvil	33
2.3.8.3. Preparación de los estándares	33
2.3.8.4. Preparación de las muestras	33
2.4 SEGUIMIENTO DEL CRECIMIENTO DEL BABACO	34
2.5 DETERMINACIÓN DEL RENDIMIENTO DEL LÁTEX	34
2.6 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA	35
2.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS	36
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
3.1 OBTENCIÓN DE LÁTEX FRESCO	37
3.2 SEGUIMIENTO DEL CRECIMIENTO DEL BABACO	41
3.2.1. FENOLOGÍA DEL FRUTO	41
3.3. CARACTERIZACIÓN DEL LÁTEX	45
3.3.1. LÁTEX FRESCO	45
3.3.2. LÁTEX LIOFILIZADO	49
3.4. ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA	52
3.4.1. RELACIÓN RENDIMIENTO DE LÁTEX LIOFILIZADO	54
4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	57
4.1 Conclusiones	57
4.2 Recomendaciones	58
BIBLIOGRAFÍA	59
ANEXOS	62

ÍNDICE DE TABLAS

	PÁGINA
Tabla 1. Estudio sobre los constituyentes volátiles del babaco	6
Tabla 2. Composición química del babaco	9
Tabla 3. Caracterización del látex fresco de babaco	19
Tabla 4. Identificación de los tubos de ensayo	28
Tabla 5. Datos experimentales de longitud con la edad del fruto	42
Tabla 6. Datos experimentales del diámetro con la edad del fruto	43
Tabla 7. Peso de látex fresco del árbol 1 con la edad del fruto	46
Tabla 8. Peso de látex fresco del árbol 2 con la edad del fruto	47
Tabla 9. Valores de rendimientos de látex fresco según la edad	48
Tabla 10. Valores de pH, °Brix, densidad, % humedad de látex fresco	48
Tabla 11. Rendimientos de látex liofilizado por cantidad de frutos	49
Tabla 12. Valores de A_w , % proteína, concentración de proteína	50
Tabla 13. Valores promedios del contenido de azúcares	50
Tabla 14. Valores promedios del contenido de ácidos orgánicos	51
Tabla 15. Valores de actividad proteolítica de acuerdo con la edad	53
Tabla 16. Peso de látex liofilizado y actividad proteolítica	54
Tabla 17. Rendimientos de látex fresco por babaco	55
Tabla 18. Contenido de humedad en 100 g de látex fresco	55
Tabla 19. Actividad proteolítica de diferentes investigadores	56
Tabla 20. Valores experimentales de Act. proteolítica látex liofilizado.	62

ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1. Planta de babaco	3
Figura 2. Vista superior de las hojas de una planta de babaco	4
Figura 3. Floración de un babaco en la planta	5
Figura 4. Planta de babaco con frutos en la parte inferior	6
Figura 5. Coloración de los frutos desde el color verde hasta amarillo	8
Figura 6. Corte longitudinal, primer día de corte	20
Figura 7. Cicatrización a la semana de corte	21
Figura 8. Vista interna de la plantación	22
Figura 9. Selección y obtención del látex fresco	23
Figura 10. Recipiente que contiene el látex fresco	25
Figura 11. Látex del fruto en el primer corte	37
Figura 12. Látex del fruto en el segundo corte	38
Figura 13. Planta de babaco con <i>Fusarium</i>	39
Figura 14. Planta de babaco con <i>Fusarium</i> extraída látex	40
Figura 15. Fruta con <i>Fusarium</i> extrayéndose látex	40
Figura 16. Cintas de colores en frutos de acuerdo con su edad	41
Figura 17. Longitud vs. Edad del fruto	42
Figura 18. Diámetro vs. Edad del fruto	44
Figura 19. Frutos de 5 y 8 meses de edad	44
Figura 20. Muestras de látex fresco	45
Figura 21. Peso de látex fresco vs. Edad	46
Figura 22. Peso de látex fresco con relación a la edad del fruto	47

Figura 23. Actividad proteolítica promedio con relación a la edad	53
Figura 24. Actividad proteolítica del látex lio. con el peso del látex	54
Figura 25. Titración de látex liofilizado con sosa en el tiempo	63

ÍNDICE DE ANEXOS**PÁGINA****ANEXO A**

Determinación de la actividad proteolítica del látex liofilizado

62

GLOSARIO

Actividad proteolítica: Es una forma de medir la actividad que tiene una proteasa o enzima proteolítica. Expresa la cantidad de un sustrato que se convierte en producto, por una unidad de tiempo. Se determina experimentalmente, bajo condiciones que se deben especificar.

Baya: Es el tipo más común de fruto carnoso simple, en el cual la pared entera del ovario madura generalmente en forma de un pericarpio comestible, ejemplos son la uva, el tomate, el aguacate ,la berenjena, la guayaba y el pimiento.

Estacas: Es una porción del tallo o un brote de una planta utilizado para injertarlo en otra o para plantarlo en el suelo, con el fin de que produzca raíces y dé origen a una nueva planta.

Enzimas: Son macromoléculas, que actúan como catalizadores en los sistemas biológicos que determinan el patrón de las reacciones químicas y median las transformaciones de diferentes formas de energía. A excepción de un pequeño grupo de moléculas de RNA catalítico, todas las enzimas son proteínas altamente especializadas.

Epitelio: Es un tejido de recubrimiento, formado por una fina capa de células, las cuales generalmente tienen una función secretora.

Papaína: Es el nombre dado por Wurtz y Bouchut (1879), para el constituyente activo proteolítico en el látex de la fruta tropical papaya (*Carica papaya*).

Sitio activo: Es una región tridimensional específica de la enzima donde se forma el complejo enzima-sustrato (ES).Representa un pequeña parte del volumen total de la enzima.

NOMENCLATURA

A_w:	Actividad de agua
A_λ:	Absorbancia a una longitud de onda
g:	Gramos
mg:	Miligramos
μg:	Microgramos
mL:	Mililitros
μL:	Microlitros
cm:	Centímetros
mm:	Milímetros
μm:	Micrómetros
nm:	Nanómetros
U:	Unidad enzimática
UV:	Radiación ultra violeta
HPLC:	Cromatografía líquida de alta resolución
BAPNA:	Hidrocloruro de N- α - Benzoil-D, L-Arginina-p-Nitroanilida
BSA:	Albúmina de Suero Bovino
DMF:	Dimetilformamida
GP:	Grado de purificación
p-NPA:	Acetato de para-nitro fenilo
TCA:	Ácido tricloro acético
DTT:	Ditiotreitol
EDTA:	Ácido Etilen diamino tetraacético
NAD:	Nicotinamida adenina nucleótido
FAD:	Flavin adenina dinucleótido

RESUMEN

En esta investigación se efectuó el estudio de la actividad proteolítica del látex del babaco (*Vasconcellea heilbornii* cv babaco) en función de la edad del fruto.

El Ecuador al ser un país muy diverso en frutas y aplicada la Biotecnología podría extraer las enzimas presentes en dichos materiales. La papaína es una enzima que se extrae del látex de la papaya, la misma que ha sido empleada por más de 200 años atrás, aunque su nombre científico fue creado recientemente.

El babaco es una fruta de la familia de las caricáceas al igual que la papaya de la cual se han aislado y caracterizado algunas enzimas proteolíticas y lipolíticas, las mismas que podrían extraerse del látex de dicha fruta. Para caracterizar el látex de babaco se cuantificaron algunas propiedades como el pH, contenido de sólidos solubles (°Brix), densidad, ácidos orgánicos, azúcares, proteínas, actividad de agua (Aw) y actividad proteolítica.

Se extrajo el látex del babaco a las edades de 5,6 y 7 meses, para determinar los rendimientos de extracción de látex. Se realizaron 3 cortes longitudinales y se colectó el látex en recipientes debidamente codificados.

Los frutos estaban aún en el árbol y los cortes realizados fueron muy ligeros para no dañar la fruta. El látex fresco fue deshidratado, por liofilización, para medir la actividad proteolítica de las frutas de 5, 6 y 7 meses edad.

Entre los resultados más importantes están que al mes 5 de edad se tuvo una actividad proteolítica de 8125,65 U/g y un rendimiento de 0,3075 g de látex liofilizado por fruto. Al mes 7 se tuvo una actividad proteolítica de 5778,89 U/g y un rendimiento de 0,3978 g de látex liofilizado por fruto.

Además, se concluyó que extraer látex de frutos en la edad del mes 8 no es conveniente por cuanto la fruta se encuentra muy cerca del período de cosecha, la cicatrización no es muy buena cuando se efectúan los cortes en su piel y, además, puede acarrear problemas a la planta.

Finalmente, se recomienda extraer el látex de frutos verdes caídos o de plantas que se destinen para dicha actividad. Dichos frutos no podrán ser vendidos al

mercado nacional, pero una vez maduros se podrían destinar para hacer pulpas, conservas, mermeladas o deshidratados.

ABSTRACT

This investigation was carried out to study the proteolytic activity of babaco latex (*Vasconcellea Heilbornii* cv babaco) depending on the age of the fruit.

Ecuador is a country which is rich with fruits and applying biotechnology, it is possible to extract the enzymes which are present in this fruit. Papaina is an enzyme which is extracted from papaya. This enzyme has been used for over 200 years, although its scientific name was assigned much later.

The babaco is from a family of fruits which has the same characteristics as the papaya. In addition, it was found that this fruit has the same types of proteolytic enzymes and lipolytic which could be extracted from the latex of the fruit.

The babaco latex was characterized by looking at its properties such as pH, ° Brix, density, organic acids, sugars, protein, water activity and proteolytic activity.

The latex was extracted from the babaco when it was 5, 6 and 7 months old to establish the yield of latex. Three longitudinal cuts were made in the fruits and the latex was collected in containers which were then coded. During this process, the fruit is still on the tree and the cuts were very fine so not to damage it.

The fresh latex was freeze dried and then the proteolytic activity of at 5, 6 and 7 months was measured. In the results, the most important information was that at the fifth month, the fruit has a proteolytic activity of 8125,65 U/g and a yield of 0,3075 g of lyophilized latex per fruit. In the seventh month, the proteolytic activity was 5778,89 U/g and a yield of 0,3978 g of lyophilized latex per fruit.

Additionally, it was concluded that extraction of latex at 8 months was not recommended as the fruit was very close to harvest time, and the cuts could damage not only the skin of the fruit but also the plant.

Finally, it was recommended extracting latex from fallen green fruits or plants which are used for this activity. The fruit cannot be sold to domestic markets but it could be used for pulps, preserves, and jam or dried.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la demanda de productos mejores, así como de procesos industriales óptimos, donde los beneficios sean para el consumidor y la industria, incentiva el estudio de nuevas tecnológicas para lograr dicha meta.

Tal es el caso de las enzimas proteolíticas y más específicamente de las proteasas, las cuales pueden utilizarse en la elaboración de muchos productos, en diversas industrias como las de alimentos, farmacéuticas, entre otras.

El babaco es un fruto de la familia de las caricáceas, del cual se puede extraer el látex crudo, rico en proteasas cuando este se encuentra inmaduro en el árbol, por lo que su aprovechamiento resulta muy beneficio para los empresarios y consumidores.

La papaína es una enzima proteolítica, que se extrae del látex de la papaya. Tiene la capacidad para digerir las proteínas de los alimentos, similar a la pepsina, una enzima que está en el jugo gástrico de los seres humanos. La enzima que se puede extraer del babaco es similar a la que se extrae de la papaya; pero, según estudios, su actividad proteolítica es más elevada que la papaína, además el látex de babaco posee enzimas lipolíticas, las cuales son muy específicas al digerir grasas (Dhuique *et al.*, 2001).

El babaco es un fruto que tiene un elevado potencial de exportación por su alto valor nutricional y porque posee componentes que mejoran el valor energético del producto. Los babacos son exóticos por su sabor. Contribuyen a mejorar la salud humana debido al aporte de enzimas y buena cantidad de vitamina C.

Pueden combatir y prevenir enfermedades (antiparasitarios, diuréticos, suplemento para regímenes especiales de alimentación, etc.) (Hernández *et al.*, 1999).

Las enzimas proteolíticas forman cerca del 60% del mercado industrial de enzimas. Las proteasas comerciales son producidas por micro-organismos, animales y plantas. Las proteasas constituyen una muy larga y compleja agrupación de enzimas usadas para transformar proteínas en simples péptidos.

La demanda mundial de papaína cruda o refinada se ha incrementado en los últimos años. Las ventas anuales estimadas de alimentos preparados con enzimas subieron de 10,1 a 16,6 millones de dólares en los Estados Unidos (Gouri, 1985). Además, los usos industriales de la papaína entre otros son la clarificación de cerveza, laudering de textiles, variedad en preparaciones farmacéuticas, etc.

Además en estudios previos se ha establecido que tiene una actividad enzimática proteolítica superior al de papaína pura (Dhuique - Mayer, 2001).

El babaco es un fruto que se consume directamente cuando ha llegado a su madurez organoléptica. Puede ser empleado para producir mermelada, jugo concentrado, frutas secas, etc. La extracción de las enzimas del látex de la fruta puede tener una aplicación industrial.

En países como Ecuador y Nueva Zelanda, el cultivo de babaco ha despertado mucho interés comercial porque tiene aspectos favorables que van desde una alta producción con rendimiento satisfactorio hasta el ser exótico, permitiendo así que mercados como los europeos abran sus puertas a dicha fruta (Villarreal *et al.*, 2003).

1. PARTE TEÓRICA

1.1. BABACO

El babaco (*Vasconcellea heilbornii*) es un híbrido natural, conocido anteriormente como "*Carica pentagona heilbornii*". La planta es originaria del Ecuador, de la zona sur del país, de la provincia de Loja. Se han encontrado algunas variedades de esta especie en forma natural en dicha zona, también en los valles templados del Patate, en la región Andina (Badillo, 2000). Esta fruta se cultiva desde antes de la conquista española y en la actualidad se consume en la serranía del país.

Se está introduciendo al mercado mundial que demanda de productos selectos y especiales con excelentes características de nutrición y sabor, para diversificar los cultivos, algunos especialistas de otros países han venido a Ecuador para introducir los cultivos en países como Nueva Zelanda, Francia, Italia, Estados Unidos, Inglaterra e Israel (Scheldeman *et al.*, 2003). Mediante el proyecto de estudio de la Valorización Integral del Babaco, llevado a cabo por el Departamento de Ciencias de Alimentos y Biotecnología, de la Escuela Politécnica Nacional, se aprovechan todas las cualidades de este fruto, para convertir la materia prima agrícola en productos biotecnológicamente procesados, con mayor valor agregado.

1.1.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

El babaco es un híbrido natural de las especies *Carica stipulata* Badillo (toronche) y la *Carica pubescens* (chamburo). Helborn, en 1922, realizó la descripción taxonómica y le asignó el nombre de *Carica pentagona heilbornii* (Merino, 1989).

Reino : Plantae

División : Magnoliophyta

Clase : Angiospermae

Subclase : Dicotyledonae

Orden : Brassicales

Familia : *Caricaceae*

Género : *Vasconcellea*

Especie : *V. Pentagona*

Nombre binomial: *Vasconcellea xheilbornii* (V. M. Badillo)

1.1.1.1. Especies relacionadas:

Chamburo (*C. pubescens*), orange papaya (*C. monoica*), papayuelo (*Carica goudotiana*), papaya (*C. papaya*), toronche (*C. stipulata*). También existen híbridos del Babaco y otras Caricas.

1.1.1.2. Afinidades distantes:

Papaya orejona (*Jacartia mexicana*), Mamao (*J. spinosa*).

1.1.2. DESCRIPCIÓN DE LA PLANTA

La planta es arbustiva, semi-perenne, de tallo erecto, cilíndrico, de consistencia esponjosa, que puede alcanzar de 2 a 3 m de altura, la cual se puede apreciar en la Figura 1. Según Merino (1989), las partes de esta planta se describen de la siguiente manera:

1.1.2.1. Sistema radicular

Las plantas adultas tienen raíces principales gruesas, de tipo carnosos, con una tendencia a la verticalidad y que no alcanzan mucha profundidad. De estas salen las raíces absorbentes, las cuales pueden ser alargadas y, según la textura del terreno, pueden encontrarse más o menos superficiales.

1.1.2.2. Tronco

Este es recto y no tiene consistencia leñosa, de color verde, cuando es joven, en los primeros meses y toma color marrón- grisáceo, cuando la planta es más

adulta. Llega a medir 2,5 m en un año y cuando es joven suele desarrollar brotes laterales, que de no ser eliminados pueden dar lugar a varios troncos.



Figura 1. Planta de babaco

1.1.2.3. Hojas

Están insertadas a lo largo del tronco, en forma alterna. El limbo es lobulado, con 5 ó 7 lóbulos. Los nervios están marcados. Tiene un pecíolo que llega a medir 50 cm. El color va de verde oscuro al claro, según las fases.

En la Figura 2, se pueden ver las formas de las hojas, en el tronco de la planta.



Figura 2. Vista superior de las hojas de una planta de babaco

1.1.2.4. Flores

Estas crecen en las axilas de las hojas y su aparición es continua, mientras hay crecimiento. Son masculinas y femeninas, en árboles separados (Cueva, 1999), de forma acampanada y normalmente solitarias. Los pétalos adquieren una tonalidad blanca-amarillenta-verdosa. Su cáliz es de color verde oscuro.

1.1.2.5. Fruto

El fruto es alargado y de sección pentagonal, provisto de una punta. No necesita polinización para su desarrollo y no tiene semillas en su interior. Un fruto de tamaño medio tiene unos 26 cm de largo por 10 cm de diámetro. Su peso oscila entre 400 y 2000 g (Merino, 1989; Soria, 1990). En la misma planta, se pueden encontrar frutos de diversos tamaños, según la edad el número oscila entre 25-30 frutos /planta /año.



Figura 3. Floración de un babaco en la planta

Posee una epidermis de color verde cuando está inmaduro y, a medida que se aproxima a la maduración, cambia a color amarillo. Su consumo se hace cuando está totalmente amarillo. La pulpa es de color blanco crema, acuoso, de sabor entre piña, fresa y naranja. Además, posee un aroma especial cuando se encuentra maduro.

Se ha comprobado que su látex posee una enzima proteolítica parecida a la papaína (Álvaro, 1992). Algunos investigadores manifiestan que entre las principales cualidades del fruto están el alto contenido de vitamina C y papaína. Se recomienda la ingesta de babaco por ser rica en fibra dietética, por lo que previene problemas digestivos (Corpei, 2005).

Varios estudios se han realizado sobre los componentes volátiles de esta fruta y los resultados muestran una totalidad de 53 componentes, los principales se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. Estudio sobre constituyentes volátiles del babaco

Nº	Compuesto	Porcentaje (%)
1	Ésteres	47,2
2	Alcoholes	30,2
3	Aldehídos y cetonas	11,3
4	Hidrocarburos	5,7
5	Compuestos de distinta naturaleza química	3,8
6	Ácidos	1,8

Fuente: Ortega y Pino, 1997.

Componentes volátiles, como el butirato de etilo y el hexanoato de etilo, tienen un olor dulce frutal, de gran importancia sensorial en el aroma del babaco y que aumentan cuando la fruta está completamente madura y su color es 100% amarillo. La Figura 4 muestra frutos de diferentes tamaños, que tienen diferentes edades. Se puede apreciar claramente que los frutos más grandes se encuentran abajo y los pequeños en la parte superior de la planta.

**Figura 4.** Planta de babacos con frutos en la parte inferior.

Se ha determinado que la fruta es climatérica, si se la cosecha antes de la madurez fisiológica, no puede madurar bajo ninguna condición de almacenamiento y presenta un pico en su tasa de respiración (Albuja, 2001; Moreno, 2002).

1.1.2.6. Reproducción

Como el fruto no posee semillas, la reproducción es solo asexual; es decir, se utiliza una parte de la planta, ya sea por estacas o por injerto que se implanta en otra planta, como el chamburo o el toronche.

1.1.2.7. Variedades

El babaco no tiene variedades definidas; sin embargo, existen diferencias en cuanto a la forma del fruto, color de la pulpa, aroma, sabor, según el lugar y las condiciones de cultivo. Un ejemplo de ello se puede encontrar entre las frutas producidas en invernadero, que presentaron un diferente contenido de azúcar que las cultivadas al aire libre (Soria, 1990).

1.1.2.8. Cosecha

El fruto presenta una coloración verde oscura cuando está en crecimiento. Si se aproxima a la maduración, en el interior de sus caras, aparecen pintas de color amarillo, que definen el grado de madurez. Una vez maduro, toma el color totalmente amarillo, con una fragancia exquisita (Corpei, 1998; Soria, 1990).

Esto suele suceder entre el mes 7 y mes 8 luego de la floración. Los primeros frutos que maduran son los que se encuentran en la parte baja de la planta que fueron los primeros en formarse.

En el momento de recolección se corta, con tijeras, el pedúnculo para que el fruto no se deteriore por daño mecánico.

Además se limpia la cáscara con un paño y se manipula con cuidado para evitar golpes y abolladuras externas, como se puede observar en la Figura 5. También se puede apreciar como los frutos van a ser comercializados en los diferentes supermercados del país.



Figura 5. Coloración de los frutos desde el color verde hasta el amarillo.

1.1.3. COMPOSICIÓN DEL BABACO

El contenido de minerales y vitaminas, así como la composición química se encuentran en la Tabla 2.

La cantidad de agua es elevada. De 100 g de fruta se tiene el 93 g de agua; 1,3 g de sodio entre los valores más altos de los componentes químicos.

Con respecto a la cantidad de energía, se tienen 21 kcal por cada 100 g de fruta fresca y una baja cantidad de grasa cuyo valor es de 0,20 g por 100 g de fruta fresca.

La cantidad de proteína tiene un valor de 0,9 g y de carbohidratos de 6 g por 100 g de fruta fresca.

La cantidad de potasio alcanza un valor de 220,00 mg y 31 mg de ácido ascórbico por 100 g de fruta fresca. Estos son los minerales en mayor abundancia, aunque existen otros que presentan menores valores pero son característicos de este fruto.

Tabla 2. Composición química del babaco.

Compuesto	Cantidad en g por 100 g de fruta fresca.
Agua	93,00
Carbohidratos	6,00
Fibra insoluble	0,70
Fibra soluble	0,38
Grasa	0,20
Proteína	0,90
Energía (kcal)	21,00
Sodio	1,30
	Cantidad en mg por 100 g de fruta fresca.
Potasio	220,00
Calcio	10,00
Fósforo	17,00
Azufre	12,00
Riboflavina	0,03
Carotenos	0,09
Tiamina	0,02
Piridoxina	0,05
Ácido ascórbico	31,00

Fuente: Dietosystem, 1999

1.2. ENZIMAS PROTEOLÍTICAS

1.2.1. ASPECTOS GENERALES DE LAS ENZIMAS

Las enzimas son macromoléculas, que actúan como catalizadores en los sistemas biológicos que determinan el patrón de las reacciones químicas y median las transformaciones de diferentes formas de energía. A excepción de un pequeño grupo de moléculas de RNA catalítico, todas las enzimas son proteínas altamente especializadas (Gutfreund, 1965).

Las enzimas pueden acelerar las reacciones químicas, por su estructura globular, se entrelazan y se pliegan en una o más cadenas polipeptídicas, que aportan un pequeño grupo de aminoácidos para formar el centro activo, o lugar donde se adhiere el sustrato y se puede efectuar la reacción. La enzima y el sustrato deben tener formas exactas entre sí para lograr adherirse.

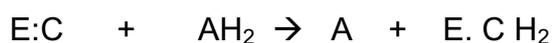
La acción de las enzimas se caracteriza por la formación de un complejo que representa en el estado de transición.

1.2.2. COFACTORES Y COENZIMAS

Existen muchas enzimas que son proteínas conjugadas, contienen grupos prostéticos de distinta naturaleza a los aminoácidos. La proteína conjugada se conoce como holoenzima y puede disociarse en un componente proteico no activo, la apoenzima y el grupo prostético no proteico, el cofactor. Algunas enzimas contienen metales, los cuales están fuertemente unidos y no se separan a no ser que su proteína se desnaturalice. Los metales pueden ayudar en el mantenimiento de la configuración estructural de la enzima nativa y con frecuencia se denominan activadores (Gutfreund, 1965).

Algunos cofactores actúan como aceptores o donadores de átomos o de grupos funcionales, que son separados o adicionados al sustrato de la enzima y se denominan coenzimas. Estos deberían considerarse, más apropiadamente como sustratos, puesto que participan estequiométricamente en la reacción catalizada y se consumen como sustratos.

Por ejemplo, una enzima (E) tiene una coenzima (C) y reaccionan con el sustrato (AH₂), como sigue:



Hay cientos de enzimas que requieren un metal o un cofactor orgánico, pero el número de metales y cofactores de los organismos es limitado. Ejemplo de cofactor es el nicotinamida adenina nucleotido (NAD), que contiene la vitamina nicotinamida y el flavin adenina dinucleotido (FAD) que forma parte de la vitamina riboflavina (Theil, 1997).

1.2.3. PROPIEDADES DE LAS ENZIMAS

1.2.3.1. Especificad de las enzimas

Las enzimas son altamente específicas en cada reacción catalizada y en sus cambios de reactantes, los cuales son llamados sustratos. Una enzima

generalmente cataliza una reacción simple o un grupo de reacciones estrechamente ligadas. Reacciones laterales que conducen al derroche de subproductos rara vez ocurren en las reacciones catalizadas al contrario de la sin catalizar. El grado de especificidad del sustrato es generalmente alto y algunas veces es absoluto.

La reacción catalizada por las enzimas proteolíticas es la hidrólisis de una cadena de péptidos. La mayor cantidad de enzimas proteolíticas también catalizan una reacción diversa pero relacionada, con la hidrolisis de una cadena de ésteres.

Las enzimas proteolíticas difieren marcadamente de su grado de especificidad del sustrato. DNA polimerasa I, un molde directo de enzima es una catálisis específica muy alta. La secuencia de nucleótidos en la hebra de DNA (ácido desoxi ribonucleico) que ha sido sintetizada es determinada por una secuencia de nucleótidos en otras hebras de DNA que sirve como molde.

La polimerasa DNA es notablemente precisa llevada a cabo fuera de las instrucciones dadas por el molde. El nucleótido incorrecto se inserta en el nuevo DNA al menos una vez en tiempos muy cortos porque la polimerasa de la DNA corrige el producto naciente y sus errores (Faber, 2000).

1.2.3.2. La actividad catalítica

Las enzimas que catalizan, tienen como primer paso en el camino de la biosíntesis ser generalmente inhibido por el último producto. La biosíntesis de la isoleucina de la bacteria ilustra ese tipo de control, la cual es llamada inhibición de retroalimentación. Teonina es convertida en isoleucina en cinco pasos, el primero de ellos es catalizado por Teonina diaminasas. Esta enzima es inhibida cuando la concentración de isoleucina llega a un nivel suficientemente alto.

La isoleucina es un inhibidor no competitivo, que se une a la enzima, en un sitio regulador, distinto del sitio catalítico. Esta inhibición es mediada por una interacción alostérica, la cual es rápidamente reversible. Cuando el nivel de isoleucina es suficientemente bajo, la teonina diaminasa llega a ser activa otra vez y consecuentemente la isoleucina es sintetizada nuevamente.

Las enzimas son también controladas por reguladores proteicos, los cuales pueden estimular o inhibir. Las actividades de algunas enzimas son reguladas por la calmodulina, una proteína de 17 kDa, que sirve como sensor del calcio en casi todas las células eucarióticas.

1.2.4. CLASIFICACIÓN Y NOMENCLATURA DE LAS ENZIMAS

Normalmente las enzimas reciben el nombre del sustrato terminado en “asa” o algún término que describe las reacciones que catalizan. Por ejemplo, la ureasa tiene la urea como sustrato. La alcohol deshidrogenasa cataliza la remoción de los hidrógenos de los alcoholes (es decir, cataliza la oxidación de los alcoholes). A pesar de ello, algunas enzimas, como la tripsina o la quimotripsina, aún se conocen por sus nombres históricos (Barret, 2004).

La Unión Internacional de Bioquímica, designó un comité que dio un esquema de clasificación que asigna un código numérico a cada enzima y clasifica a las enzimas en seis grupos importantes, de acuerdo con la clase general de reacciones químicas que catalizan:

1. Las oxidoreductasas catalizan reacciones de oxidación-reducción. La mayor parte de estas enzimas se conocen como deshidrogenasas, pero algunas de ellas reciben el nombre de oxidasas, peroxidasas, oxigenasas o reductasas.
2. Las transferasas catalizan reacciones de transferencia de grupos. Muchas de las cuales requieren la existencia de coenzimas. Estas enzimas son sustituidas en forma covalente por una porción de molécula del sustrato.
3. Las hidrolasas catalizan la hidrólisis. Son una clase especial de transferasas, el agua les sirve como receptor del grupo transferido.
4. Las liasas catalizan las reacciones de eliminación no hidrolítica, no oxidante, o lisis de un sustrato en reacciones que generan un doble enlace. En la reacción inversa, una liasa cataliza la adición de un sustrato a un doble enlace de un segundo sustrato. Una liasa que cataliza una reacción en las células se denomina con frecuencia sintasa.
5. Las isomerasas catalizan reacciones de isomerización. Debido a que estas reacciones tienen un solo sustrato y un producto, son por lo regular reacciones enzimáticas más sencillas.

6. Las ligasas catalizan la ligadura o unión de dos sustratos, en reacciones sintéticas, que requieren el ingreso de la energía química potencial de un nucleósido trifosfato, como el ATP. A las ligasas se les da el nombre de sintetetasas.

1.2.5. HIDROLASAS

Estas enzimas normalmente actúan sobre las grandes moléculas del protoplasma, como son la enzima del glicógeno, las grasas y las proteínas. La acción catalítica se expresa en la división de los enlaces entre los átomos de carbono y nitrógeno (C- Ni) o carbono y oxígeno (C-O), de manera simultánea se obtiene la hidrólisis (reacción de un compuesto con el agua) de una molécula de agua. El hidrogeno y el oxidrilo resultantes de la hidrólisis se unen respectivamente a las moléculas obtenidas por la ruptura de los enlaces antes mencionados. La clasificación de estas enzimas se realiza en función del tipo de enlacen donde actúan.

En este grupo pertenecen proteínas conocidas como pepsina, presente en el jugo gástrico, la tripsina y la quimotripsina, segregada por el páncreas. Su función es esencial en los procesos digestivos porque hidrolizan enlaces pépticos, estéricos y glucosídicos.

1.2.5.1. Proteasas

Estas enzimas sirven para romper los enlaces de las proteínas, su origen puede ser animal, vegetal y microbiano. Tienen varios niveles de pH y temperatura, ejemplos de enzimas se pueden citar los siguientes:

Enzimas de origen animal; ENZECO CHYMOTRYPSIN 1:1, la cual es derivada de las glándulas bovinas con relación de 1 unidad de tripsina: 1 unidad de quimotripsina por miligramo.

Enzimas de origen vegetal; ENZECO BROMELAIN, proteasa derivada de la piña caracterizada por su hidrólisis selectiva controlada en un rango amplio de condiciones.

Enzimas de origen microbiano – fúngico; ENZECO FUNGAL PROTEASA ACIDA, enzima fúngica de proteolítica derivada del *A. niger* con un pH óptimo de trabajo de 2,5 a 3,0.

1.2.5.2. Proteinasas

Las proteinasas o endopeptidasas hidrolizan enlaces peptídicos en el interior de las cadenas polipeptídicas. Dichas enzimas seleccionan, reconocen y fijan pequeñas secuencias parciales del sustrato y luego los enlaces se hidrolizan relativamente de una manera específica entre ciertos residuos de aminoácidos

1.2.6. ASPECTOS GENERALES DE LAS ENZIMAS PROTEOLÍTICAS

Las enzimas proteolíticas abarcan cerca del 60% del mercado de enzimas. Las proteasas comerciales son producidas por microorganismos, animales y plantas. Constituyen una larga y compleja cadena de enzimas, las cuales difieren en propiedades de acuerdo con el sustrato específico, el centro activo, y los mecanismos catalíticos, el pH, la actividad y la estabilidad con la temperatura (Theil, 1997).

Las proteasas comerciales tienen aplicaciones, en un rango amplio de los procesos, que se aprovechan de las características físicas y catalíticas. Las proteasas habían sido usadas en la coagulación de la leche para transformarla en queso, unos 5000 años antes de Cristo, cuando se observó que la leche dentro de los estómagos de los becerros, tendía a cuajarse (Rehm, 2002).

El uso del cuajo de animales y de proteasas de microorganismos, en la producción de queso, y de proteasas del *Aspergillus oryzae*, en la fermentación, eran dos de las aplicaciones más importantes de las proteasas microbianas (Ward, 1996).

Proteasas pancreáticas fueron usadas para la depilación y la rebaja del cuero. El mayor interés de los detergentes comerciales con proteasas se desarrolló desde 1960, durante 10 años. En 1969, la industria encontró una desfavorable publicidad cuando algunos de los trabajadores desarrollaron alergias, debidas al efecto de la inhalación del polvo de las enzimas. El problema fue superado por la introducción

de las preparaciones libres de polvo para usar en los detergentes. Las proteasas para detergentes alcalinos suman cerca del 25% del total de las ventas de las enzimas industriales.

Las proteasas pueden clasificarse, según su origen, en animales, vegetales, bacterianas, fúngicas. De acuerdo con su acción catalítica, en endopeptidasas, si rompen al azar el interior de las cadenas peptídicas, y en exopeptidasas, si separan los aminoácidos de los extremos de la cadena polipeptídica. Finalmente, según la naturaleza de su sitio catalítico.

La proteasa actúa sobre el enlace peptídico, lo rompe y libera el grupo amino y el grupo carboxilo. Estos grupos pueden estar parcialmente ionizados, de acuerdo con el pH del proceso de hidrólisis.

Las proteasas tienen un amplio rango de funciones en la naturaleza. Las proteinasas microbianas extracelulares contribuyen al bienestar alimenticio del organismo. Por hidrólisis de una larga cadena de polipéptidos, se producen pequeñas moléculas, que la célula puede absorber. Las proteasas pancreáticas de los mamíferos, las peptidasas intestinales y estomacales, juegan un rol nutricional similar en la digestión y en los procesos de absorción de estas especies.

Las enzimas proteolíticas también están involucradas en la regulación de los procesos metabólicos, tales como la formación y germinación de esporas; activación de ciertos virus de importancia patógena, varias etapas de la fertilización de los mamíferos, la coagulación de la sangre, la fibrinólisis, la activación de complemento, la fagocitosis y el control de presión de la sangre (Theil, 1997).

Algunos de estos procesos, como la coagulación y los sistemas de complemento, involucran cascadas de eventos proteolíticos, en donde los precursores de un número de enzimas inactivas o zimógenas son convertidos en proteasas activadas, las cuales activan otras proteasas. Estas cascadas permiten el control y la amplificación de los procesos involucrados. En todos los sistemas de una célula existe un balance entre los procesos metabólicos, que envuelven la síntesis de proteína y su ruptura, donde las proteinasas intracelulares tienen un papel vital

en los procesos de estas proteínas. Del 1 al 3% de las proteínas de una bacteria son degradadas a aminoácidos por hora y valores similares son reportados para las células de una planta en cultivo (Faber, 2000).

El volumen de proteinasas es esencial para la adaptación de las células a nuevas condiciones ambientales, particularmente donde hay ausencia de aminoácidos, se genera una sucesión de aminoácidos para la síntesis de enzimas y otras proteínas requeridas nuevamente. Hay evidencia que las proteasas están involucradas en la modulación de la expresión de los genes, en la modificación y secreción de las enzimas. El posible desempeño de las proteasas en la regulación de la traslación, por modificaciones de proteínas ribosomales, ha sido sugerido (Rehm, 2002).

Las proteasas convierten enzimas inactivas de otras moléculas biológicamente inactivas de proteínas en sus formas activas también, la remoción de N-formil metionina o metionina de las cadenas nascentes de péptidos y la hendidura del producto de la traslación del mRNA monocistrónico, la codificación para las distintas cadenas de péptidos es mediada por proteasas. Finalmente, durante la secreción extracelular de enzimas, la extensión del péptido hidrofóbico, el cual facilita el paso de la enzima a través de la membrana de la célula es separado por acción proteolítica, que desbloquea la enzima extracelular (Ward, 1980).

1.2.7. PROPIEDADES DE LAS PROTEINASAS

La especificidad de las enzimas proteolíticas está, primordialmente, relacionada con la naturaleza de la cadena lateral de los aminoácidos y otros productos cercanos al enlace que se hidroliza. Además, estas enzimas pueden ser separadas en dos grupos, según su habilidad para hidrolizar los enlaces de los aminoácidos que se encuentran cercanos en los extremos (exopeptidasas) o en el interior (endopeptidasas), de la cadena peptídica.

Godfrey y Reichelt (1983) han informado acerca de una reactividad comparativa de varias importantes proteinasas comerciales, frente a diferentes sustratos, cuando cada uno es probado a su pH óptimo. Esto demuestra que la reactividad relativa de esas enzimas varía con cada sustrato. Otro aspecto de la complejidad

de la catálisis de las proteasas es la observación de que el pH óptimo para la actividad puede variar con cada sustrato. La proteasa ácida de *Aspergillus* tiene un pH óptimo de 8,0 frente a la caseína, pero de 4,0-5,0 con la hemoglobina, como sustrato (Fujimaki *et al.*, 1980). Se han revisado los factores que influyen en la degradación de las proteínas, como la especificidad enzimática, la concentración de sustrato, concentración de enzima, el límite de la desnaturalización, el pH, la temperatura, la presencia de inhibidores y activadores. Los enlaces peptídicos están más expuestos y susceptibles al ataque proteolítico, cuando las proteínas se despliegan debido a la desnaturalización.

1.2.7.1. Descripción de las proteasas

Las proteasas, conocidas también como peptidasas o enzimas proteolíticas, catalizan reacciones de hidrólisis, que rompen los enlaces peptídicos de las proteínas o de las cadenas polipeptídicas y dan como resultado péptidos más pequeños o aminoácidos libres.

1.2.7.2. Codificación de las proteasas

De acuerdo con la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (UIBBM), las proteasas reciben el código EC 3.4, por ser hidrolasas que catalizan la ruptura de enlaces peptídicos (Moss, 1987).

1.2.7.3. Cisteíno proteinasas

Las cisteíno proteinasas poseen un grupo cisteíno en su sitio activo. Suelen ser activadas mediante el empleo de agentes reductores, como el ácido cianhídrico (HCN) o la cisteína. En su mayoría, estas enzimas presentan una actividad óptima a los valores ácidos o neutros de pH (Grudkowska y Zagdanska, 2004).

Este grupo incluye más de 40 familias de enzimas, agrupadas en 6 superfamilias o clanes. En el reino vegetal, las cisteíno proteinasas se encuentran en las plantas de las familias Caricaceae, Bromeliaceae y Moraceae. Dentro de las cisteíno proteinasas, se incluyen algunas enzimas de notable importancia industrial, como la papaína, la quimopapaína, la bromelina y la ficina (Grudkowska y Zagdanska, 2004).

1.2.8. APLICACIÓN DE LAS PROTEASAS

Las aplicaciones son muy diversas y se puede pensar que serían similares a las de la papaína, proveniente del látex de la papaya y otras proteasas entre las cuales se pueden enumerar las siguientes (Theil, 1997);

a. Industria cervecera. La papaína sirve para evitar que la cerveza se enturbie al congelarla. La turbidez se debe a las proteínas, que al bajar la temperatura de almacenamiento, coagulan al formar coloides.

b. Industria de la carne. La papaína degrada las proteínas de alto peso molecular y provoca el ablandamiento de la carne. Este método de ablandamiento de las carnes es utilizado en los frigoríficos luego del *rigor mortis*.

c. Industria del cuero. La hidrólisis controlada con proteasas permite que el colágeno disminuya las protuberancias y da un fino aspecto al cuero.

d. Industria textil. La papaína se usa para desengomar la seda, por lo general con un tratamiento previo al baño desgomizante principal. También se utiliza en la industria de la lana, para reducir el encogido al lavar y para mejorar la calidad de las tinturas usadas.

e. Industria medicinal. La papaína se utiliza en el tratamiento de la difteria, úlceras sifilicas, eczemas, psoriasis, la cera que se forma en los oídos y herpes. También son un analgésico importante usado en medicamentos tales como los que se aplican a las dismenorreas femeninas.

f. Industria de alimentos (jugos). La papaína es muy utilizada en el pre-tratamiento de las frutas destinadas a jugos y aceites esenciales, así como en vinos para clarificar en situación similar a la industria cervecera.

g. Industria de alimentos (dietéticos infantiles). Las proteasas se emplean en la producción de alimentos especiales para bebés. Se mejora la capacidad de asimilación de los alimentos, al degradar proteínas de alto peso molecular a cadenas más cortas, de fácil incorporación al torrente circulatorio alimenticio del bebé.

1.3. LÁTEX Y OBTENCIÓN

Al ser cortada, la piel del babaco exuda un látex, definido como un líquido lechoso de color blanquecino, no muy denso presente en hojas, tallo y frutos (Álvaro, 1992). El látex debe ser cuidadosamente almacenado para evitar la agitación excesiva externa, cambios de pH y la presencia de metales contaminantes, que podrían desnaturalizar las enzimas presentes en el mismo.

Para la obtención del látex se realizan cortes superficiales de 2 mm de profundidad, sin dañar la fruta, para evitar la propagación de hongos y que la cicatrización sea rápida (Villarreal *et al.*, 2003). Los frutos cortados siempre presentan huellas luego de la extracción y por eso no pueden ser comercializados, como los frutos cuyo látex no ha sido extraído. Así se establece que los frutos que son vendidos al octavo mes son manejados con sumo cuidado, para evitar golpes y la pérdida en el precio de venta.

El látex puede irritar la piel humana, por eso se recomienda usar guantes para su extracción. La papaína, que se vende en el mercado mundial, se extrae del látex de la papaya. Se ha establecido que la enzima que se puede extraer del babaco es similar y con una actividad proteolítica superior (Villarreal *et al.*, 2003). Algunos investigadores han diferenciado el látex producido cuando es recién cortado el fruto, como un líquido lechoso, designado látex fluido; diferente al látex coagulado, que se produce cuando se ha secado, luego de ser cortado (Sinche, 2009).

En el presente estudio se utiliza el término látex fresco por cuanto es el látex que sale en el primer minuto luego de efectuar el corte y además el fruto está aún en el árbol. El látex fresco de babaco está constituido principalmente por lípidos, proteínas, carbohidratos y agua, cuyos contenidos se detallan en la Tabla 3.

Tabla 3. Caracterización del látex fresco de babaco.

Contenido	Valor
Humedad (%)	80,47
Proteína (%)	12,34
Carbohidratos (%)	5,83
Lípidos (%)	1,36

Fuente: Ruales, 2003.

La mejor manera de obtener el látex se logra al hacer cortes longitudinales, sin interrupciones y muy finos, para que su cicatrización sea más rápida. Una visualización de los cortes y la cicatrización se muestran en la Figura 6, durante el primer día de corte.



Figura 6. Corte longitudinal, primer día de corte

En la Figura 7, se muestra la cicatrización del corte del mismo fruto, luego de 7 días de haber sido efectuada la extracción del látex.

Además se puede apreciar residuos del látex que no ha sido recolectado al final del corte en la superficie del fruto así como la cicatrización ha sido perfecta sin ocasionar daños posteriores a la planta y a los demás frutos que están en cercanos al fruto ,el cual ha sido sometido al proceso de extracción del látex fresco.



Figura 7. Cicatrización a la semana de corte.

1.3.1. PRINCIPIO DE LA DESHIDRATACIÓN POR LIOFILIZACIÓN

La liofilización es un procedimiento de secado, cuyo principio es la sublimación del hielo de un producto congelado; por lo tanto, el agua del producto pasa directamente del estado sólido al estado de vapor, en una cámara al vacío (Mafart, 1991).

Por regla general, este método da lugar a productos de más alta calidad que en cualquier otro método de secado, pero el costo energético es elevado, debido a los sucesivos cambios de estado del agua y a la necesidad de usar vacío (Brennan *et al.*, 1998; Mafart, 1991).

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. MATERIA PRIMA

Las muestras de látex de babaco fueron tomadas de la plantación de 1000 m² de la Finca “Los Algarrobos”, ubicada en Cayambe, provincia de Pichincha. Las plantas, se desarrollaron bajo invernadero, con riego por goteo y personal especializado para su cuidado.

Los árboles tenían 2 años edad, aproximadamente, con una altura que superaba 1,5 m. Se seleccionaron los frutos 100 % inmaduros y cuyas edades fueron de 5, 6 y 7 meses. Los frutos en dichas edades tenían una coloración verde en su corteza.

En la Figura 8, se muestra una fotografía de los árboles estudiados.



Figura 8. Vista interna de la plantación

2.2. OBTENCIÓN DEL LÁTEX

2.2.1. DETERMINACIÓN DE LA EDAD DEL FRUTO

De acuerdo a la fenología, que fue determinada previamente se pudo relacionar la longitud con la edad del fruto.

En la Figura 9, se puede observar la medición de la longitud de un fruto con dicho parámetro se le relacionó con la edad y así se seleccionaron los babacos que fueron extraídos el látex.

Para comprobar que la selección fue correcta se medía también el diámetro y se relacionaba con la edad, así usando ambas dimensiones que se encontraron en la fenología del fruto, se podía obtener la edad del fruto de manera más precisa y precisa.



Figura 9. Selección y obtención de látex fresco

2.2.2. EXTRACCIÓN DEL LÁTEX FRESCO

La recolección del látex se desarrolló en horario matutino, desde las 7 am hasta las 10 am, los días miércoles durante 3 meses, cada 2 semanas. Para ver cómo se comportaban las plantas luego de haber cortado la corteza de los frutos de forma muy ligera.

Se seleccionaron los frutos para la extracción del látex de acuerdo con su edad, que se determinó con la medición de la longitud del fruto, mediante una regla. Se relacionó la longitud del fruto con la edad, de acuerdo con su fenología.

Se limpió la superficie del fruto seleccionado con un paño para retirar la cera de su superficie y las impurezas que se pudieran encontrar.

Con un bisturí, se realizaron tres cortes superficiales a lo largo del fruto, desde el pedúnculo hasta la punta, en la arista de cada fruto. El látex fue recolectado en recipientes plásticos, previamente esterilizados y etiquetados.

La persona que colectó usó guantes para evitar cualquier contaminación. Los cortes se realizaron sin retirar los frutos del árbol, de manera que estos puedan ser cosechados y aprovechados posteriormente. Se recolectó el látex fresco durante un lapso del primer minuto de efectuado el corte y no se colectó el látex que se coagulaba después del corte en la fruta. Además se observó el crecimiento de los frutos después de haber sido sometidos a dicho proceso mediante fotografías tomadas en cada extracción y medición de su longitud.

En cada visita a la plantación, se emplearon 5 árboles para cada edad. Siempre se extrajeron látex de frutos de árboles diferentes. Se pesaron los recipientes con el látex fresco extraído para hacer los cálculos respectivos del rendimiento de acuerdo con la cantidad de frutos empleados en cada extracción. Posteriormente, el látex fue almacenado en congelación a $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Después, las muestras se sometieron a un proceso de liofilización, en un equipo Leybol modelo LYOVAC GT2, en cajas Petri, de 9 cm diámetro, utilizadas como bandejas de secado. El látex liofilizado se homogenizó y se almacenó en refrigeración (8°C), para usarlo después en la caracterización.

2.3. CARACTERIZACIÓN DEL LÁTEX DE BABACO

Para caracterizar el látex de babaco, se midió el pH, la densidad, la actividad del agua (A_w), así como los contenidos de sólidos solubles, humedad, ácidos orgánicos, azúcares y proteínas.

En la misma plantación y en el momento de la extracción, para obtener mejores resultados, se determinó el pH y el contenido de sólidos solubles. Después, en el laboratorio, se volvieron a medir para determinar si existía variación de dichas propiedades en el tiempo de transporte.

En la Figura 10, se puede observar un recipiente donde se recolectó el látex.



Figura 10. Recipiente que contiene el látex fresco.

2.3.1. MEDICIÓN DE pH

Se homogenizaron las muestras de látex fresco contenido dentro de los recipientes con leves movimientos circulares. Se realizaron tres mediciones en cada recipiente con la ayuda de un pH metro Coming 320 digital.

2.3.2. MEDICIÓN DE LA DENSIDAD

Se usó una pipeta automática marca Oxford, con la cual se midió 1 mL de látex, que se colocó en papel aluminio, que se encontraba dentro de una balanza electrónica, previamente encerada.

Se registró el peso. Este procedimiento se realizó dos veces con cada muestra. Luego se calculó la densidad mediante la Ec. 1.

$$\textit{densidad} = \textit{masa} / \textit{volumen} \quad (\text{Ec. 1})$$

2.3.3. MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE AGUA (A_w)

Se empleó un medidor de actividad de agua (A_w) marca LUFFT 5804. Se dejó que el medidor llegue al valor 0,9 de referencia, durante 2 horas. En la cámara vacía se colocó una muestra de látex liofilizado, de aproximadamente 200 mg.

Luego de 12 horas se registró el valor que marcó el medidor y se colocó la nueva muestra. Se efectuaron muestras paralelas para cada lote y se midieron en los látices de las plantas de 5, 6 y 7 meses de edad.

2.3.4. MEDICIÓN DEL CONTENIDO DE SÓLIDOS SOLUBLES

Se empleó un refractómetro portátil marca Westover RHB 32, al cual se abrió la tapa y se limpió el cristal. Se colocó una gota de látex en su cristal y luego se cerró la tapa. Se colocó el medidor a la luz y se miró por su lente la escala de °Brix y se registró el valor.

2.3.5. MEDICIÓN DEL CONTENIDO DE HUMEDAD

Se determinó el contenido de humedad del látex mediante el método descrito por la Association of Oficial Analytical Chemists (AOAC) 920.151(37.1.12) (2000).

2.3.6. MEDICIÓN DEL CONTENIDO DE PROTEÍNAS

El método que se utilizó para la determinación de proteínas fue el descrito por Bradford (1976), basado en el acoplamiento del colorante Coomassie Brilliant Blue, con la proteína.

Se determinó la absorbancia por espectrofotometría visible, a 595 nm. Se empleó el método de Bradford Reagent de SIGMA, para micro ensayos de 96 celdas, en un espectrofotómetro Multiskan EX.

Se prepararon las muestras, por triplicado, previo al análisis del contenido de proteínas, según el procedimiento que se indica a continuación.

1. Se pesaron 10 mg de látex y 10 mL de agua destilada en tubos plásticos.
2. Se homogenizó la suspensión, con agitación magnética, por 10 min.
3. Se centrifugó la suspensión a 5900 rpm por 10 min.
4. Se extrajo el líquido sobrenadante de los tubos con una pipeta automática calibrada marca Oxford.
5. Se identificaron los tubos de ensayos.
6. Se pusieron las muestras en los tubos previamente identificados.
7. Se efectuaron diluciones de las muestras en la primera 0,4 mL de muestra y 3,6 mL de agua y la segunda 1 mL y 3 mL de agua.
8. Se puso 1 mL de muestra diluida y 1 mL de Coomasie plus.

La preparación de la curva de calibración se desarrolló así:

1. De una ampolla de B.S.A. se tomaron 0,1 mL y se diluyeron en un matraz de 5 mL, con agua destilada
2. Se tomaron 2 mL de la dilución y se colocaron en un tubo de ensayo.
3. Se identificaron los tubos de la manera que se indica en la Tabla 4.

Tabla 4. Identificación de los tubos de ensayo

Tubo N°	Vol. B.S.A (mL)	Vol. H ₂ O (mL)	Vol. Total (mL)
Blanco	0,0	1,0	1,0
8	0,2	0,8	1,0
12	0,3	0,7	1,0
16	0,4	0,6	1,0
20	0,5	0,5	1,0

4. Se agitó un poco a cada tubo en un agitador marca Vortex.
5. Se agregó 1 mL de reactivo Coomasie a cada tubo.
6. Se dejó reposar por 5 min.
7. Se observaron que las muestras estén dentro del rango de coloración de la curva de calibración.
8. Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm en el equipo ya indicado.
9. Se pusieron las condiciones adecuadas para el uso del equipo.
10. Se leyeron las absorbancias de las soluciones preparadas para la obtención de la curva de calibración.
11. Se leyeron las absorbancias de las muestras y se graficó.
12. Se realizó una regresión lineal simple de la curva y se calculó el coeficiente de correlación. Con base en la ecuación se obtuvo la concentración de la muestra.

2.3.7. MEDICIÓN DEL CONTENIDO DE ÁCIDOS ORGÁNICOS

El contenido de ácidos orgánicos fue determinado por HPLC, mediante el método modificado de Anderson y Hedlund (1983).

Se emplearon 200 mg de muestra liofilizada y 5 mL de agua, que fueron mezclados y homogenizados. La mezcla fue dejada en reposo por 30 min y luego centrifugada. El sobrenadante fue colectado y el residuo fue lavado dos veces con 5 mL de agua.

El líquido sobrenadante fue reunido y filtrado (GV Millipore 0,22 μ m). El análisis fue desarrollado en un HPLC (Beckman 110 B), aminex HPX 87H columna de exclusión iónica (300 X 7,8 mm BioRad) precedida por una columna (BioRad).

Fueron inyectados 20 μ L de muestra en el HPLC. La temperatura se mantuvo constante. La columna fue recubierta con plexiglás, a través del cual fue bombeada constantemente agua, a 40 °C.

2.3.7.1 Equipos, materiales y reactivos en la medición de ácidos orgánicos

a. Materiales

Matraz de 50 mL

Matraz de 25 mL

Embudo de vidrio

Probeta de 50 mL

Centrífuga

Tubos de centrifuga

Cromatografía líquida de alta presión

Columna : aminex HPX – 87H

Flujo : 0,45 mL/min

Presión : 114 Bar

Temperatura: 40°C

b. Reactivos

Agua desionizada

Ácido sulfúrico (grado analítico), marca Merck.

Estándares del ácido ascórbico, cítrico, tartárico y málico, marca BDH, Chemical Ltd., England.

c. Condiciones del detector y del integrador

Detector : UV a 210 nm, BW4; REF 580 nm BW20, PkWidth 0,1 min
 UV a 244 nm, BW4 ; REF 580 nm BW20, PkWidth 0,1 min
 para ácido ascórbico

Integrador :	Zero level = 5	Attenuation = 5
	ChtSp = 0, 2	Area rejection = 80000
	Threshold = 5	Peak Width = 0,15

Lazo de inyección : 20 µL

d. Tiempos de retención y corrida

10,4 min	ácido cítrico
11,2 min	ácido L (+) – tartárico
12,5 min	ácido L (-) – málico
12,5 min	ácido L – ascórbico (a 244 nm)

Tiempo de corrida: 30 min

2.3.7.2. Preparación de la fase móvil

H₂SO₄ 0,02 N (0,555 mL de H₂SO₄ 96% / L). Se filtró por una membrana de 0,45 µm.

2.3.7.3. Preparación de estándares ácidos CÍTRICO, TARTÁRICO y MÁLICO

Se pesaron separadamente 30 mg de cada uno de los estándares y se disolvió con H₂SO₄ 0,02 N que contenía ácido meta fosfórico al 0,05 % y homocisteína al 0,02 %, en un matraz de 50 mL (concentración 600 ppm).

Se preparó una mezcla de estándares con concentraciones entre 20 y 600 ppm. Se hicieron diluciones 1: 100, 2: 100, 2: 50, 1:10, 1: 5 de cada uno de los estándares. Las diluciones se prepararon con H₂SO₄ 0,02 N con ácido meta fosfórico 0,05 % y homocisteína 0,02 %

2.3.8. MEDICIÓN DEL CONTENIDO DE AZÚCARES

Se empleó cromatografía líquida de alta resolución. Se usaron los estándares correspondientes de los azúcares; ramnosa, xilosa, fructosa, glucosa y sacarosa. Se determinaron los parámetros de operación de la columna como el flujo, la presión y la temperatura. Se inyectaron las muestras y se efectuaron las corridas necesarias.

2.3.8.1. Materiales y reactivos

a. Materiales

Matraz de 50 mL

Matraz de 25 mL

Matraz de 10 mL

Embudo de vidrio

Probeta de 50 mL

Centrífuga

Tubos de centrifuga

Cromatografía líquida de alta resolución

Columna : NH₂Polymer Columna, 250 – 4 (ASTEC)

Flujo : 1,3 mL / min

Presión : 124 Bar

Temperatura : 30 °C

b. Reactivos

Agua desionizada

Acetonitrilo, grado HPLC

Estándares de ramnosa, xilosa, fructosa, glucosa y sacarosa

c. Condiciones del detector y del integrador

Detector : Índice de refracción a 30 °C

Integrador : Zero level = 5

Attenuation = 8

ChtSp = 0, 2

Area rejection = 2000

Threshold = 9

PeakWidth = 0,15

TIME TABLE : time 0 int () 11

Lazo de inyección: 20 µL

d. Tiempos de retención y corrida

Tiempos de retención:

5,6 min	L - ramnosa
7,4 min	L- xylosa
8,3 min	D - fructosa
11,5 min	D (+) galactosa
11,5 min	D (+) glucosa
19,3 min	sacarosa

Tiempo de corrida: 30 min

2.3.8.2. Preparación de la fase móvil

Se preparó una solución de acetonitrilo : agua ,en proporción 80:20, que se filtró por una membrana de 0,45 µm.

2.3.8.3. Preparación de los estándares

Se pesaron, separadamente, 2500 mg de cada uno de los estándares y fueron disueltos con la siguiente mezcla de acetonitrilo : agua cuya proporción fue 50:50 en un matraz de 25 mL (concentración 100 mg/mL)

Se preparó una mezcla de estándares de concentraciones entre 2 y 20 mg/mL. Se hicieron diluciones 2/100, 1/20 y 1/5, de cada uno de los estándares. Se diluyeron con acetonitrilo : agua, 50:50.

2.3.8.4. Preparación de las muestras

Se pesaron 200 mg de muestra en un matraz de 5 mL, se añadieron 2,5 mL de agua desionizada y se mantuvo con agitación magnética, durante 15 min. Se aforaron con acetonitrilo, grado HPLC, hasta 5 mL.

Se transfirió el contenido a un tubo y fue centrifugado por 8 min a 4000 rpm y 5 °C. Se separó el sobrenadante y fue filtrado por una membrana de 0,45 µm. Después fue inyectado en el HPLC.

2.4. SEGUIMIENTO DEL CRECIMIENTO DEL BABACO

Para registrar el crecimiento de los frutos de babaco se procedió de la siguiente manera:

La primera semana se visitó la plantación y cuando las flores del babaco empezaban a formar el fruto, se les colocó un anillo de color en su pedúnculo, se empezó con el color blanco, normalmente se marcaron a 4 ó 5 frutos. Con un calibrador, se midió el diámetro y con una regla la longitud de los frutos seleccionados, luego semana a semana se efectuaron las debidas visitas para realizar las mismas operaciones.

Se emplearon cintas de colores de acuerdo con la edad, cada color de cinta correspondía a una semana de crecimiento. Se efectuaron las visitas los días miércoles para así relacionar adecuadamente el crecimiento con la edad. Este procedimiento fue realizado durante 34 semanas o desde el mes 0 hasta el mes 8, es decir, desde la floración hasta la madurez de los frutos, para así determinar la fenología de la planta de babaco.

2.5. DETERMINACIÓN DE RENDIMIENTOS DEL LÁTEX

En cada visita se obtuvieron 3 recipientes que contenían el látex fresco de los frutos de cada edad a estudiarse. Se pesaron los recipientes con el látex fresco, para hacer los cálculos respectivos del rendimiento de acuerdo con la cantidad de frutos empleados, en cada extracción y en cada visita. Posteriormente, el látex fue almacenado en congelación a -22 °C.

Además en pruebas preliminares se extrajo también pasado el medio día pero la cantidad de látex fresco era siempre menor que en el horario establecido.

Una vez que las muestras fueron liofilizadas se determinó su peso y rendimiento de acuerdo con la cantidad de frutos empleados en cada extracción.

2.6. MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA

Se determinó la actividad proteolítica con una solución de caseína (5,55 g) preparada en 50 mL, con DTT (Ditiotreitol) 2mM y EDTA (ácido Etilen diamino tetraacético) 10 mM, como activadores.

La mezcla fue agitada con un agitador magnético a 300 rpm, y llevada a condiciones homogenizadas óptimas para reacciones catalizadas por papaína, a una temperatura de 45 °C, por 10 min de tiempo de incubación y a un pH constante de 7,5 (Mckee y Smith, 1986).

Después de la incubación, en dichas condiciones las reacciones proteolíticas fueron iniciadas con la adición de una preparación de caseína / enzima en proporción de 0,5 % (w/w), con 25 mg de preparación de 5 g de caseína. Estas cantidades fueron pesadas exactamente. Las cadenas separadas de péptidos fueron automáticamente titulados con solución acuosa de NaOH, con una concentración de 0,5 M.

La actividad proteolítica fue descrita por Caro *et al.*, 2000 b, las actividades proteolíticas fueron calculadas como la velocidad inicial de reacción por regresión polinomial, de segundo orden, del gráfico del volumen de sosa usado con relación al tiempo empleado en la titración.

Se obtuvo el valor del coeficiente del término lineal de la ecuación de segundo orden, el cual es la velocidad de reacción y después de procedió a calcular la actividad proteolítica de acuerdo con la cantidad de látex liofilizado empleado en el experimento mediante la Ec 2.

$$Act. Proteolítica \left(\frac{U}{g} \right) = \frac{Velocidad\ de\ reacción \times 0,5 \times 1000000}{Peso\ muestra\ Liofilizada\ (25\ mg) \times 0,66} \quad (Ec. 2)$$

2.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Los resultados presentados de la longitud y el diámetro de los frutos son el promedio de los valores obtenidos de los frutos estudiados, que se tomaron de 5 árboles que empezaban su floración hasta alcanzar su tiempo de cosecha al mes 8. El valor promedio se acompaña con su respectiva desviación estándar.

Los demás resultados son el promedio de los valores obtenidos en tres repeticiones de cada ensayo con su debida desviación estándar.

Mediante el programa estadístico STATGRAPHICS Plus se realizó la prueba de comparación múltiple de DUNCAN, con límites de confiabilidad del 95% ($p \leq 0,05$).

3. RESULTADOS

3.1. OBTENCIÓN DE LÁTEX FRESCO

Se determinó que hacer cortes longitudinales continuos es mucho mejor, por cuanto el látex recorre toda la superficie y se puede recolectar en los recipientes, además mejor en las aristas porque en pruebas preliminares se determinó que si se hacían cortes transversales o cortes sucesivos en la misma arista no permitía una rápida cicatrización.

Las operaciones fueron delicadas con los frutos, para evitar que estos se caigan al terreno. Se realizó el corte en la arista y se recolectó el látex por un minuto para proceder a efectuar otro corte en el mismo fruto pero en diferente arista y recolectar en el mismo recipiente como se puede apreciar en la Figura 11.



Figura 11. Látex del fruto en el primer corte

En la Figura 12, se puede apreciar la recolección del látex en el segundo corte.

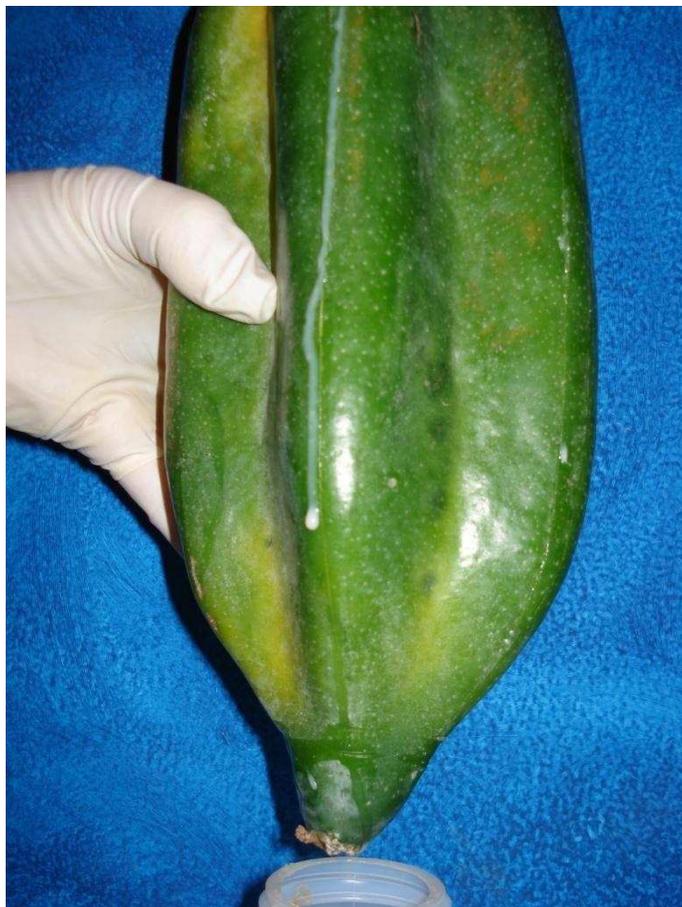


Figura 12. Látex del fruto en el segundo corte

Se extrajo látex de frutos de 8 meses, en pruebas preliminares pero las frutas presentaron serios inconvenientes en su cicatrización y eran propicios a favorecer el desarrollo de hongos en sus frutos, lo que ocasionaba serios problemas a toda la planta.

En la Figura 13, se puede apreciar una planta atacada por *Fusarium*, dicha enfermedad es una de las más comunes debida a esta, ha perdido muchos frutos.

Esto ocasiona muchas pérdidas económicas al agricultor que solo vende frutos completamente sanos, cuando estos llegan al tiempo de cosecha presentando una alternativa de poder usar dichos frutos solo para extracción de látex.



Figura 13. Planta de babaco con *Fusarium*

En la Figura 14, se puede apreciar la misma planta mostrada en la Figura 13, a la cual se le extrajo látex, sin ningún inconveniente, lo que abrió la posibilidad de no solo usar el látex de frutos de plantas sanas.

No se logró caracterizar este látex, para determinar si existían diferencias significativas con los frutos de plantas sanas empleadas en la presente investigación, pero se observó que los frutos con dicha enfermedad se lograron cicatrizar de una manera adecuada sin presentar posteriores problemas luego de que fueron sometidos al proceso de extracción de látex fresco aún estando en la planta para que sigan creciendo.

En la Figura 15, se puede apreciar el látex de un fruto de la planta enferma mostrada anteriormente. El látex recorre el fruto y las manchas cafés en la piel indican la enfermedad que tiene la planta.



Figura 14. Planta de babaco con *Fusarium* extraída látex



Figura 15. Extracción de látex de un fruto con *Fusarium*

3.2. SEGUIMIENTO DEL CRECIMIENTO DEL BABACO

En la Figura 16, se puede apreciar una planta de babaco con las cintas de colores que se colocaban semana a semana para determinar la fenología.



Figura 16. Cintas de colores en frutos de acuerdo con su edad

3.2.1. Fenología del fruto

De acuerdo con el procedimiento propuesto para determinar la fenología del fruto se obtuvieron los datos de la longitud promedio con su correspondiente desviación estándar y edad, que se muestran en la Tabla 5, con los que se efectuó la Figura 17.

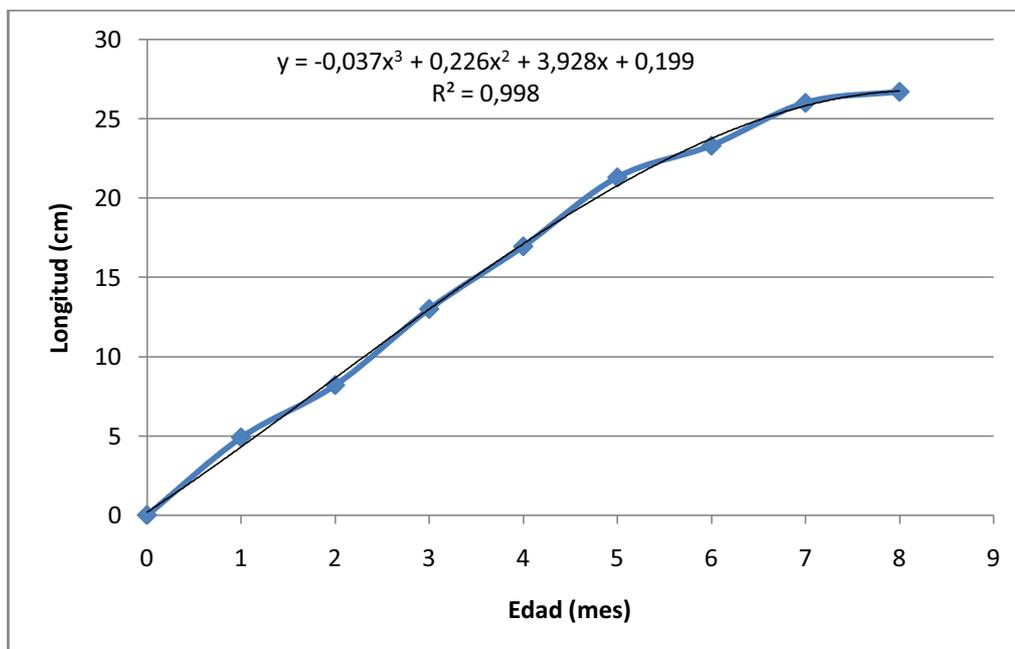
Tabla 5. Datos experimentales de longitud con relación a la edad del fruto

Edad (mes)	Longitud	Promedio
	(cm) X	n=5 DS
0	0,00	0,00
1	4,90	0,20
2	8,20	0,10
3	13,00	0,15
4	16,95	0,10
5	21,30	0,20
6	23,30	0,25
7	26,00	0,10
8	26,70	0,10

X = Promedio
n = 5

DS = desviación estándar

En la Figura 17, se relaciona la longitud promedio con la edad mensual de los frutos, se escogió la regresión cúbica porque presentó un $R^2=0,998$ obteniéndose un buen ajuste entre los valores experimentales y los teóricos obtenidos aplicando la ecuación.

**Figura 17.** Longitud vs. Edad del fruto

De la curva se puede observar que la velocidad de crecimiento es mayor hasta el sexto mes, luego tiene un crecimiento más lento, en los meses posteriores y a partir del séptimo mes el crecimiento es mínimo.

De acuerdo con el procedimiento propuesto, para determinar la fenología del fruto se obtuvieron los datos del diámetro y edad que se muestran en la Tabla 6 con lo que se efectuó la Figura 18.

Tabla 6. Datos experimentales del diámetro con relación de la edad del fruto

Edad (mes)	Diámetro	Promedio
	(mm) X	n=5 DS
0	0,00	0,00
1	13,70	0,10
2	23,40	0,20
3	44,15	0,40
4	61,75	0,20
5	73,50	0,30
6	88,13	0,20
7	93,50	0,10
8	100,50	0,20

X = Promedio
n = 5

DS = desviación estándar

En el Figura 18, se relacionó el diámetro promedio con la edad mensual de los frutos, se escogió la regresión cúbica porque presenta un $R^2=0,997$ y el cual es cercano a 1, por lo que se estimó que era lo más adecuado.

De la curva se puede observar que la velocidad de crecimiento es mayor hasta el sexto mes, luego presenta un crecimiento más lento, en los meses posteriores.

Observando las Figuras 17 y 18 presentan la alternativa de usar alguna de esas dos dimensiones del fruto para poder evaluar de una manera más adecuada la edad del fruto porque ambas coinciden en la forma del crecimiento del fruto de babaco.

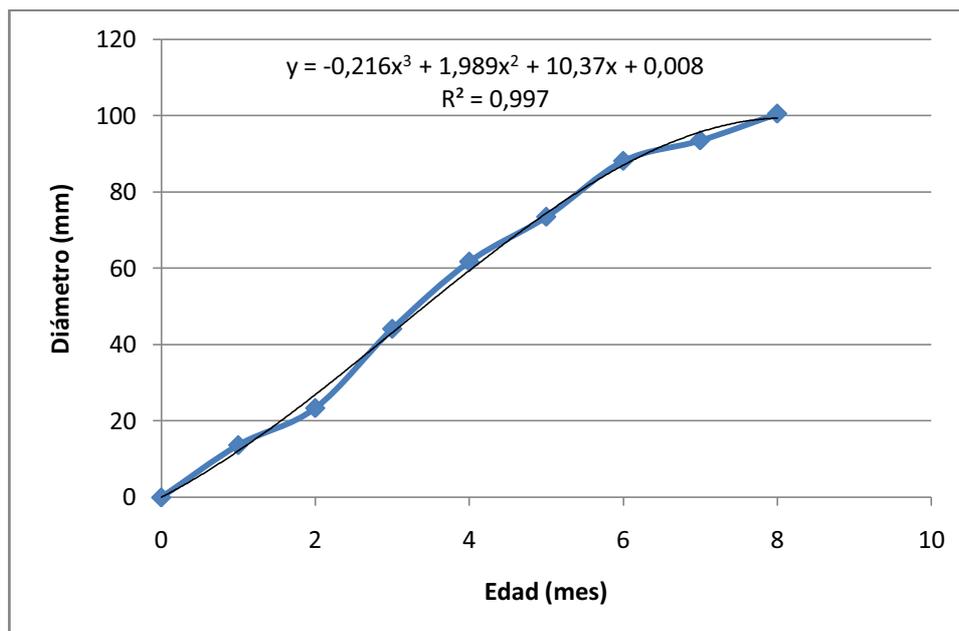


Figura 18. Diámetro vs. Edad del fruto

Se podría emplear la medición de ambas dimensiones para determinar la edad aunque el trabajo resulte muy delicado por el peligro de hacer caer los frutos. En la Figura 19, se puede mirar 2 frutos de 8 meses y 5 meses. El fruto del mes 5 tiene una coloración verde mientras que el fruto del mes 8 tiene una coloración amarilla.

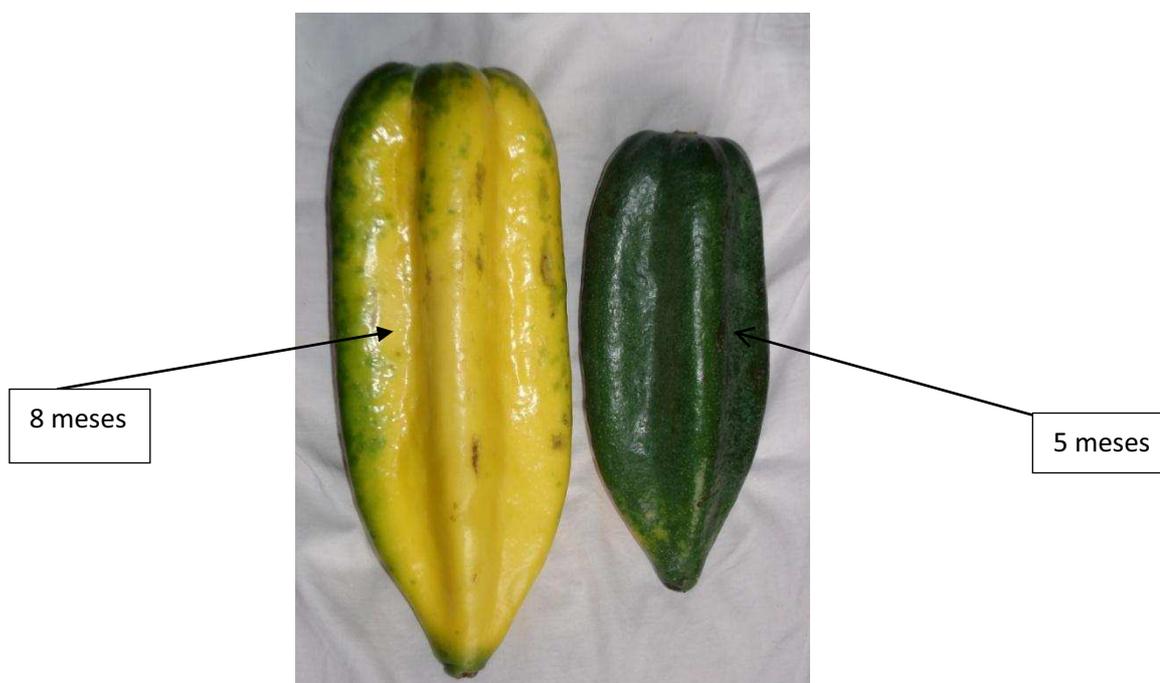


Figura 19. Frutos de 8 y 5 meses de edad

3.3. CARACTERIZACIÓN DEL LÁTEX

En la Figura 20, se pueden observar muestras de látex fresco que se encontraban dentro de los recipientes.



Figura 20. Muestras de látex fresco

3.3.1. Látex fresco

Se realizaron pruebas preliminares en dos árboles que se habían caído y se recolectó el látex de todos sus frutos, los cuales se les relacionó con su edad de acuerdo con sus dimensiones y se efectuaron las tabulaciones correspondientes.

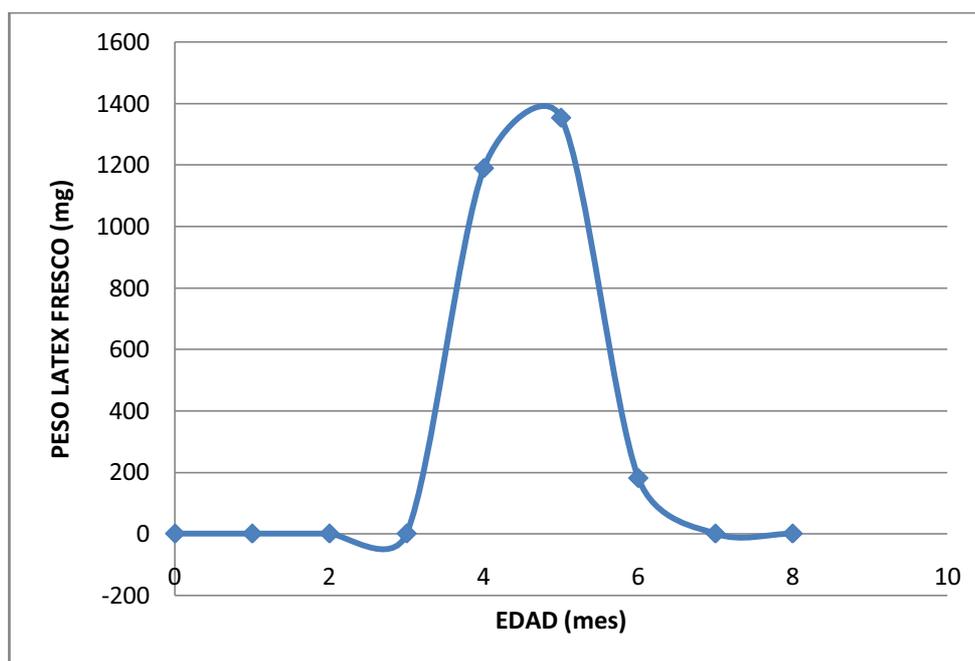
Árbol 1

Cuando se extrajo el látex de los frutos de este árbol no se pudo recolectar ninguna muestra a edades de 0, 1, 2, 3, 7 y 8 meses como se observa en la Tabla 7 porque se podría pensar que este tuvo más tiempo en el suelo caído.

Tabla 7. Peso de látex fresco con respecto a la edad del fruto

Edad (mes)	Peso látex Fresco (mg)
0	0,00
1	0,00
2	0,00
3	0,00
4	1189,46
5	1353,60
6	180,60
7	0,00
8	0,00

En la Figura 21, se observa que la mayor cantidad de látex fresco recolectado fue al quinto mes. Los datos corresponden al promedio de 4 frutos.

**Figura 21.** Peso de látex fresco vs. edad

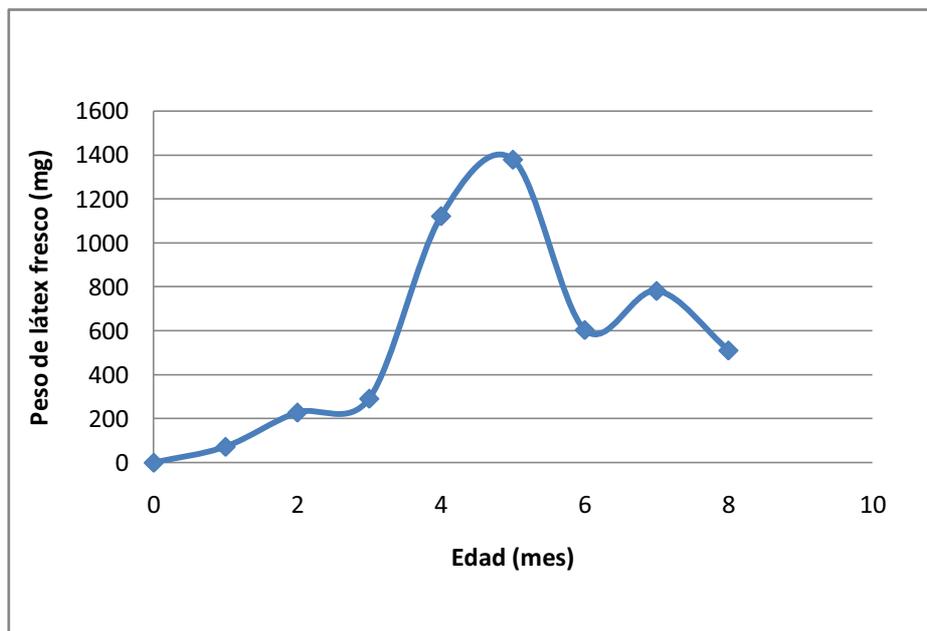
Árbol 2

Cuando se extrajo el látex de los frutos de este árbol, en el mes 0 no se pudo recolectar ninguna muestra de látex; pero, en los demás meses sí fue posible hacerlo, como se observa en la Tabla 8.

Tabla 8. Peso de látex fresco con relación a la edad del fruto

Edad (mes)	Peso látex Fresco (mg)
0	0,00
1	72,38
2	228,40
3	291,40
4	1122,40
5	1379,53
6	604,10
7	781,93
8	511,03

En la Figura 22, se pudo observar que la mayor cantidad de látex fresco recolectado del árbol 2 fue al quinto mes. Los datos corresponden al promedio de 4 frutos.

**Figura 22.** Peso de látex fresco con relación a la edad del fruto

Al comparar las Figuras 22 y 23 de los árboles 1 y 2, se determinó que la mayor cantidad de látex fresco se extrajo al quinto mes. Mayores rendimientos de látex fresco se obtuvieron en el quinto mes, teniéndose un máximo.

Se observó que la cantidad de látex crudo aumentaba con la edad hasta el mes 5, para luego observar una reducción del contenido del látex extraído.

En la Tabla 9 se muestran los resultados de los rendimientos promedios de látex fresco extraído a los 5, 6, y 7 meses de edad de árboles sanos, que fueron estudiados en esta investigación.

Tabla 9. Valores de rendimientos de látex fresco por fruto según la edad

Edad (mes)	Rendimiento látex fresco (g/ fruto)	Desviación estándar
5	2,54	0,01
6	1,31	0,05
7	1,87	0,02

En la Tabla 10, se muestran los resultados promedios de pH, contenido de sólidos solubles (°Brix), Densidad, % Humedad de látex fresco extraído a los 5, 6, y 7 meses de edad de árboles sanos, que fueron estudiados en esta investigación.

Tabla 10. Valores promedios de pH, Contenido de sólidos solubles (°Brix), Densidad, % Humedad por fruto, según la edad

Edad (mes)	pH	°Brix	Densidad (g/mL)	Humedad (%)
5	7,06 ± 0,02	18,00 ± 0,01	1,03± 0,02	87,89± 0,12
6	6,94± 0,03	19,75± 0,05	1,06± 0,04	73,48± 0,30
7	6,92± 0,04	20,00 ± 0,02	1,08 ± 0,05	78,73 ± 0,10

X= promedio ; DS =desviación estándar ; n=3

De la Tabla 10, se puede determinar que al mes 5 el fruto tuvo un valor más alto de pH cuyo valor fue de $7,06 \pm 0,02$ y no varía drásticamente con relación a los meses posteriores.

En el mes 5, se pudo observar que el contenido de sólidos solubles, tuvo el valor más bajo de $18,00 \pm 0,01$ (°Brix), la densidad tuvo un valor de $1,03 \pm 0,02$ (g/mL) y la mayor humedad porcentual tuvo un valor de $87,89 \pm 0,12$.

3.3.2. Látex liofilizado

Se extrajo de las muestras la mayor cantidad de agua presente en ellas y se obtuvo un polvo blanco amarillento, el cual se utilizó para los posteriores análisis y determinaciones.

En la Tabla 11, se muestran los rendimientos de látex liofilizado, por fruto, según la edad.

Tabla 11. Rendimientos de látex liofilizado por fruto.

Edad (mes)	Rendimiento látex liofilizado (g/ fruto)	Desviación estándar
5	0,3075	0,015
6	0,3474	0,022
7	0,3978	0,011

X= promedio; DS = desviación estándar ; n=5

En la Tabla 11, se puede apreciar que al mes 7 de edad del fruto el rendimiento es el mayor que los meses anteriores con un valor de $0,3978 \pm 0,011$ g/fruto.

En la Tabla 12, se muestran los valores promedio de la actividad de agua, porcentaje de proteína, concentración de proteína.

Tabla 12. Valores promedio de actividad de agua (Aw), % proteína, concentración de proteína

Nº	Edad (mes)	Actividad de agua (Aw)	Proteína (%)	Concentración proteína (µg/ mL)
1	5	0,44 ± 0,10	36,22± 0,16	9,5080 ± 0,21
2	6	0,43 ± 0,21	35,66 ± 0,15	8,9077 ± 0,33
3	7	0,52 ± 0,10	37,75 ± 0,19	9,3439 ± 0,14

X= promedio; DS =desviación estándar ; n=5

En la Tabla 12, se puede observar que al mes 5, la actividad de agua tuvo un valor de $0,44 \pm 0,10$ menor que al mes 7 de la edad del fruto. El porcentaje de proteína fue menor al mes 5, con un valor de $36,22 \pm 0,16$.

Existe una relación directa en el desarrollo del color y la concentración de proteínas. La ventaja del método es su simplicidad (solamente un reactivo) y su rapidez (5 min). Pero su desventaja es la variabilidad del color con diferente proteínas (Gallardo, 2004).

En la Tabla 13 se muestran los resultados del contenido de azúcares como xilosa y sacarosa.

Tabla 13. Valores promedio de contenido de azúcares

Nº	Edad (mes)	Xilosa (mg/mL)	Sacarosa (mg/mL)
1	5	0,07517 ± 0,004	0,03919 ± 0,003
2	6	0,05342 ± 0,007	0,04435 ± 0,009
3	7	0,02849 ± 0,005	0,04821 ± 0,003

X= promedio ; DS =desviación estándar ; n=5

Con el uso de HPLC se cuantificaron la xilosa y sacarosa en el látex de babaco. Glucosa, fructosa, galactosa, y ramnosa no fueron detectados en las muestras. Los contenidos de Xilosa decrecieron a medida que la fruta madura, no así con los contenidos de sacarosa que se incrementaron con la edad del fruto.

De la Tabla 13 se observa que el contenido de xilosa al mes 5 tiene un valor de $0,07517 \pm 0,004$ mg/mL, mayor que los meses posteriores, en tanto que al mes 7 se tiene un valor de $0,02849 \pm 0,005$ mg/mL.

El contenido de sacarosa al mes 5 tiene un valor de $0,03919 \pm 0,003$ mg/mL siendo la menor que en los meses siguientes y al mes 7 se tiene un valor de $0,04821 \pm 0,003$ mg/mL.

En la Tabla 14, se muestran los resultados del contenido de los ácidos cítrico y ascórbico.

Tabla 14. Valores promedio del contenido de ácidos orgánicos

Nº	Edad (mes)	Ácido Cítrico (mg/mL)	Ácido Ascórbico (mg/mL)	Ácido Ascórbico (%)
1	5	$44,5190 \pm 0,014$	$0,5064 \pm 0,043$	87,89
2	6	$56,2546 \pm 0,024$	$0,5630 \pm 0,079$	99,92
3	7	$38,9074 \pm 0,015$	$0,5380 \pm 0,023$	72,32

X= promedio ; DS =desviación estándar ; n=5

En los frutos, se encuentra por lo general como ácidos orgánicos mayoritarios el cítrico y el málico, y predomina el uno o el otro según la fruta. Existen además otros ácidos orgánicos minoritarios, se clasifican los más importantes en dos grupos ácidos intermediarios del ciclo del ácido cítrico (ácido succínico, ácido pirúvico, ácido fumárico, ácido isocítrico, ácido láctico, ácido oxálico etc.) y ácidos fenólicos (ácido químicico, ácido clorogénico, ácido siquímico). Se puede encontrar también en las frutas otros ácidos como el lacturónico y glucurónico.

En el látex de babaco se encontró ácido cítrico que es entre 70 y 100 veces el contenido de ácido ascórbico.

No se observó una misma relación de ácido cítrico /ácido ascórbico a diferentes edades del fruto.

De la Tabla 14, se puede apreciar que el contenido de ácido cítrico al mes 5 tiene un valor de $44,5190 \pm 0,014$ mg/mL, siendo mayor que con relación al mes 7 pero menor que con el mes 6, por lo que se podría entender que con la madurez el fruto tiene menor cantidad de ácido cítrico, al mes 7 tiene un valor promedio de $38,9074 \pm 0,015$ mg/mL.

El contenido de ácido ascórbico al mes 5 tiene un valor de $0,5064 \pm 0,043$ mg/mL, en cambio al mes 7 tiene un valor de $0,5380 \pm 0,023$ mg/mL, pero siendo el mayor valor al mes 6.

El contenido de ácidos orgánicos como el cítrico y el ascórbico tiene un comportamiento muy diferente con relación a las otras propiedades estudiadas que algunas decrecen o se incrementan con la edad siendo o mayor al quinto mes o menor, no obstante aquí es al sexto mes donde se presento mayores valores promedios, además siempre se tiene una mayor desviación estándar en esta edad, podría deberse a la disminución del crecimiento a partir de esta edad.

Entre los métodos cromatográficos usados para la determinación de ácidos orgánicos hay trabajos que aplican cromatografía de gases pero actualmente es muy frecuente la determinación de estos ácidos orgánicos por HPLC, se destacan los estudios de Polo y col. (1986) y López y col. (1989) que se proponen un método en fase reversa previa la purificación de la muestra.

3.4. ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA

En la Tabla 15, se muestran los resultados de la medición de la actividad proteolítica promedio del látex liofilizado de frutos cuyas edades fueron de los meses 5, 6 y 7.

Tabla 15. Valores de actividad proteolítica promedio de acuerdo con la edad del fruto.

Edad (mes)	Act. Proteolítica promedio	
	(U/g)	DE
5	8125,65	136,33
6	6445,40	463,35
7	5778,89	15,15

X= promedio; DS =desviación estándar; n=3

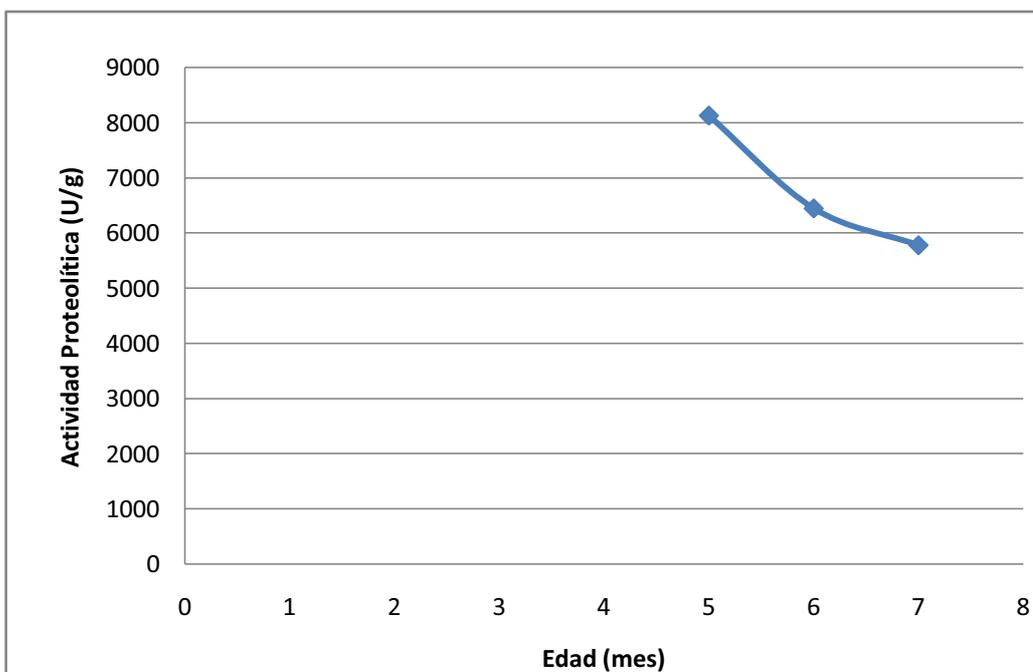


Figura 23. Actividad proteolítica promedio con relación a la edad

De la Figura 23, se puede apreciar que la actividad proteolítica disminuye con la edad. Es mayor en el mes 5, con un valor de 8125,65 U/g con una desviación promedio de 136,33 U/g.

En el mes 6, se aprecia que tiene una mayor desviación promedio debido al mayor crecimiento del fruto.

En el mes 7, se tiene una actividad proteolítica menor con un valor de 5778,89 U/g con una desviación promedio de 15,15 U/g.

3.4.1. ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA Y RENDIMIENTO DE LÁTEX LIOFILIZADO

Tabla 16. Peso de látex liofilizado y actividad proteolítica

Edad (mes)	Rendimiento látex Liofilizado (g)	Act. Proteolítica (prom)(n=3)	
		X	DE
5	0,3075	8125,65	136,33
6	0,3475	6445,40	463,35
7	0,3978	5778,89	15,15

1. Peso de látex liofilizado en gramos por cantidad de frutos

De la Figura 24, se puede apreciar que al mes 5 se tiene menor peso de látex liofilizado aunque su actividad proteolítica es mayor, no así en el mes 7 que se tiene menor actividad proteolítica, pero mayor peso de látex liofilizado.

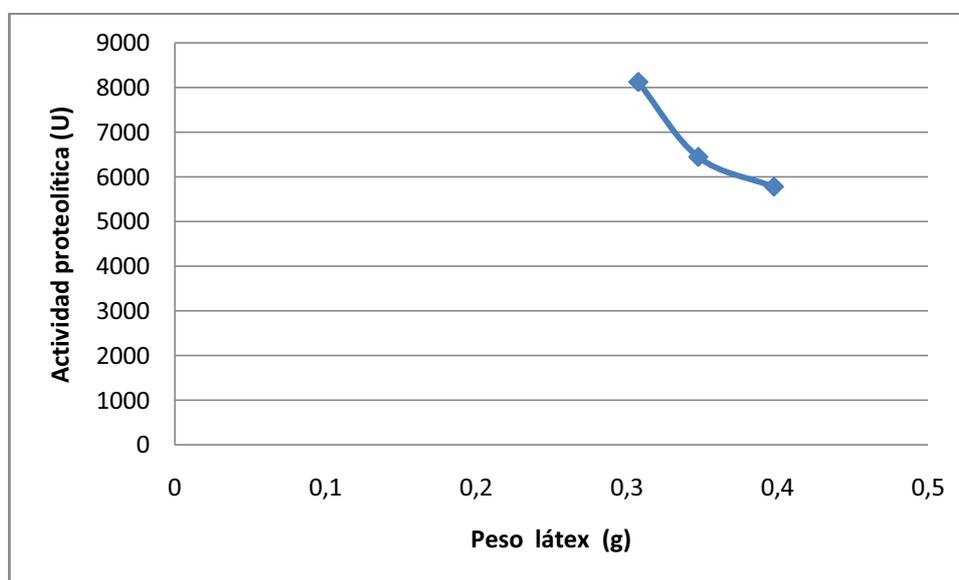


Figura 24. Actividad proteolítica del látex liofilizado con relación al peso del látex

Comparando los resultados obtenidos de rendimientos de látex fresco de Marcillo, en el 2005, dan que al quinto mes es 2,24 g con una desviación de 0,27 y al séptimo mes, que sería su día 60 obtuvo 1,79 g con una desviación de 0,9.

Mientras de la Tabla 17, se pueden apreciar mejor dicha comparación.

Tabla 17. Rendimientos de látex fresco por babaco

Rendimientos	Acosta (2011)	Rendimientos	Marcillo (2005)
Edad(mes)	Peso látex (g)	Edad(día)	Peso(g)
5	2,54±0,01	0	2,24±0,27
6	1,31±0,05	30	1,71±0,08
7	1,87±0,02	60	1,79±0,09

Marcillo (2005) parte de aproximadamente del mes 5 porque mide la longitud de 20 cm, y se observa que resultados no son contradictorios con los obtenidos en este trabajo, sino más bien confirman lo obtenido ya que ponen de manifiesto que al quinto mes el rendimiento de látex fresco es mayor que los meses posteriores evaluados.

Con relación a la humedad en el látex fresco se puede comparar con otros resultados obtenidos previamente y reportados por Ruales (2003), Marcillo (2005), siendo muy concordantes con los resultados obtenidos en este estudio.

Tabla 18. Contenido de humedad en 100 g de látex fresco

Edad(mes)	Acosta (2011)	Ruales (2003)	Marcillo (2005)
5	87,89±0,2	80,47±0,5	79,24±0,4
6	73,48±0,7		
7	78,73±0,3		

Como se puede apreciar los resultados son muy similares estimándose que la variación de dichos podría ser por la diferente metodología empleada.

Según Marcillo (2005) la mayor actividad proteolítica del látex liofilizado está en el mes 5 y disminuye en el mes 7 estando acorde con los resultados obtenidos, como se emplearon diferentes métodos para medir dicha propiedad los valores son algo diferentes no así con los resultados de Sinche (2009), que estudió específicamente la actividad proteolítica de la caseína y obtuvo un valor muy cercano al expuesto en el presente trabajo y donde se determinó que la mayor

actividad proteolítica está en el mes 5 del fruto. Lo expuesto anteriormente se encuentra en la Tabla 19.

Tabla 19. Actividad proteolítica específica de diferentes investigadores

	Acosta (2011)		Marcillo (2005)		Sinche (2009)
Edad(mes)	Act. proteolítica U/g	Edad (día)	Act. proteolítica U/g	Edad (mes)	Act. proteolítica U/g
5	8125,65±136,33	0	7700	5	8100
6	6445,40±463,35	30	5200	6	
7	5778,89±15,15	60	4800	7	

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. CONCLUSIONES

- ❖ El látex liofilizado de babaco presenta una mayor actividad proteolítica cuando el fruto tiene en el mes 5 de edad, en promedio 8125,65 (U/g) con una desviación promedio de 136,33 (U/g).
- ❖ Extraer látex de babaco al mes 8 no es conveniente por cuanto la fruta se encuentra muy cerca del período de cosecha y la cicatrización no es muy buena cuando se efectúan los cortes en su piel para extraer el látex y además puede acarrear problemas a la planta.
- ❖ Se puede extraer látex de babacos aunque estos tengan la enfermedad más común como el *Fusarium*, que se evidencia con unas manchas marrón en su corteza, a pesar de que no se estudió si sus características físicas y químicas difieren mucho de los frutos sanos, pero se estima que el mayor problema será con su rendimiento por cuanto esos frutos son más pequeños que los sanos.
- ❖ La cicatrización de los cortes de la fruta es muy buena cuando se extrae el látex al mes 5.
- ❖ El mayor rendimiento de látex deshidratado (látex liofilizado) se ha conseguido cuando el látex se obtuvo de frutos cuya edad fue del mes 7, cuyo valor promedio es 397,8 mg por fruto.
- ❖ Las propiedades físicas y químicas no presentan una mayor variación en función de la edad de la fruta, respecto a pH, contenido de sólidos solubles y densidad.
- ❖ Se encontró la presencia de xilosa, cuya concentración decrece con la madurez del fruto siendo el mayor valor en el mes 5, el cual fue de un valor de 0,07517 mg/mL.
- ❖ Mientras que la cantidad de sacarosa incrementa casi 10 Ug/mL desde 0,03919 mg/mL que tiene en el mes 5 hasta el mes 7.
- ❖ El contenido de ácido cítrico es de 44,519 mg/mL en la fruta cuando el fruto tiene mes 5 y decrece hasta 38,9074 mg/mL en el mes 7.

- ❖ El ácido ascórbico no presenta mayores cambios durante el crecimiento de la fruta porque va desde 0,5064 mg/mL cuando tiene en el mes 5 hasta el valor de 0,538 mg/mL cuando tiene mes 7.
- ❖ La actividad de agua del látex tiene un valor de 0,44 a la edad de 5 meses y llega a 0,51 cuando su edad es de 7 meses.
- ❖ Las plantas al crecer pueden perder muchos frutos si estos no son manejados apropiadamente, por lo que el tener frutos maduros es muy costoso, pero si se extrae el látex de los frutos verdes caídos o de plantas que se destinen para esa actividad, dichos frutos no podrán ser vendidos al mercado nacional pero se podría destinar para hacer pulpas, conservas, mermeladas o deshidratados.

4.2. RECOMENDACIONES

La extracción del látex del fruto debe ser hecha con mucho cuidado porque si es muy profundo el corte puede dañar la fruta y se pueden producir hongos que ataquen a todo el árbol.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aktinson, M., 1991, "Biochemical Engineering and Biotechnology". Second edition, pp. 521-570.
2. Álvaro, T., 1992, "Investigación de una proteasa obtenida a partir de látex de babaco", Tesis previa a la obtención del título de Ingeniero Químico, Escuela Politécnica Nacional, Quito- Ecuador, pp. 3 - 50.
3. AOAC, "Official Methods of Analysis", 2000, 920. 151 (37.1.12), 922.06 (32.1.14), 940.26 (37.1.18) y 2001.11.
4. Barret, R. y Woessnerr, N., 2004, "Handbook of Proteolytic Enzymes". Elsevier Science. Second edition, pp. 22-34.
5. Blom, H. y Carlsson, J., 2003, "Babaco enzymes". International report. Center for surface biotechnology, Uppsala University, Uppsala – Sweden.
6. Cambon, E., Gouzou, F., Pina, M., Barea, B., N., Lago, R., Ruales, J., Tsai, S-W. y Villevieu, P., 2006, "Comparision of Lipase Activity in Hidrolysis and Acyl Transfer Reactions of Two latex Plant Extracts from Babaco (*Vasconcellea x heilbornii* Cv.) and Plumeriarubre: Effect of the Aqueous Microenvironment, J. of Agric". And Food Chem., 54, pp. 2726 – 2731.
7. Carpio, C., 1999, "Degradación del almidón de yuca mediante el uso de enzimas inmovilizadas con el propósito de obtener jarabes de alto contenido de glucosa y maltosa". Tesis de Maestría previa a la obtención del título de Magister en Ciencia de Alimentos. Escuela Politécnica Nacional, Quito – Ecuador y Universidad de la República, Montevideo –Uruguay, pp. 14-24.
8. Cueva, O., 1999, "Plantas silvestres comestibles del sur del Ecuador", Ediciones Abya- Yala, Ecuador, Quito, pp. 24 -28.
9. Dietosystem., 1999, "Composición química del babaco", México, pp. 36.
10. Dhuique – Mayer, C., Caro, Y., Pina, M., Ruales, J., Dornier, M. y Graille, J., 2001, "Biocatalytic properties of lipase in crude latex from babaco fruit (*Carica Pentagona*)", Biotechnology letters 23, 1021- 1024, 1024.
11. Dhuique – Mayer, C., Villarreal, L., Caro, Y., Ruales, J., Villeneuve, P. y Pina, M, 2003, "Lipase activity in alcoholysis and esterification reactions of crude látex from babaco fruit (*Carica Pentagona*)", OCL, 10 (3), 232-234.

12. Faber, K., 2000, "Biotransformations" Springer – Verlag, Berlin - Heidelberg, pp.2 -16,126-136.
13. Fujimaki, M., Kato, H y Arai, S.,1980, "Revisión de las enzimas proteolíticas", Agricultura, Bioquímica, 44:685- 6.
14. Grudkowska, M. y Zagdanka, B., 2004, "Multifunctional role of plant cysteine proteinases", Acta Biochimica Polonia, Polonia, 51 (3).
15. Gutfreund, H., 1965, "An introduction to the study of Enzymes", Blackwell Scientific Publications, London, pp. 6-44, 170-208.
16. Godfrey y Reichelt., 1983, "Purification and characterization of proteases from hepatopancreas".
17. Marcillo, V., 2005. "Efecto de dos tipos alternos de secado en la actividad enzimática de látex de babaco (*Vasconcellea Heilbornii* cv babaco)". Tesis previa a la obtención del título de Ingeniera Química, Escuela Politécnica Nacional, Quito- Ecuador, pp. 3-12.
18. Merino, D., 1989. "El cultivo de babaco", Ediciones Mundi-prens, Madrid-España, pp. 11-28, 53-59.
19. Moreno, C., 2002. "Estudio de postcosecha del babaco". Tesis previa a la obtención del título de Ingeniera Química, Escuela Politécnica Nacional, Quito-Ecuador, pp. 31-40.
20. Moss, P., 1987, "Cepas productoras de enzimas proteolíticas", Biotechnology.
21. Pereira, S., 2011, "Elaboración de leche de quinua (*Chenopodium quinoa*, *Wild*)". Tesis previa a la obtención de título de Ingeniero Agroindustrial, Escuela Politécnica Nacional, Quito-Ecuador, pp.17-25.
22. Ponce, G., 1990, "Concentrados y aislados de proteína de quinua en alimentos infantiles" Tesis previa a la obtención del título de Ingeniero Químico, Escuela Politécnica Nacional, Quito- Ecuador, pp. 19-22.
23. Rehm, H., 2002, "Der Experimentator: Protien biochemie/ Proteomics". 4. Auflage, Heidelberge - Berlin, Spektrum, Akad, pp. 3- 16, 107-110, 173-205.
24. Romero – Rodríguez, M., Vásquez-Oderis M., López-Hernández ,J. and Simal-Lozano, J., 1994,"Composition of babaco, feijoa, passion fruit and tamarillo in Galacia", Food Chemistry, 49, 23-27.
25. Ruales, J., 2003, "Utilización integral del babaco (*Vasconcellea heilbornii* cv babaco)", Informe técnico PROMSA AQ –CV-010, Departamento de Ciencia

- de Alimentos y Biotecnología (DECAB), Escuela Politécnica Nacional, Quito-Ecuador.
26. Scheldeman, X., Romero- Motoche, J., Van Damme, V. y Heyens, V., 2003, "Potencial of highland papayas (*Vasconcella*) in Southern Ecuador", pp. 24.
 27. Soria, M., 1990, "Utilización de la quinua como refuerzo proteico en productos alimenticios de consumo amplio" Tesis previa a la obtención del título de Ingeniero Químico, Escuela Politécnica Nacional, Quito- Ecuador, pp. 14-20.
 28. Sinche, M., 2009, "Aislamiento, purificación parcial y caracterización cinética de las proteasas presentes en el látex de los frutos de una planta del género *Vasconcella*, Proyecto previo a la obtención del título de Ingeniero Agroindustrial, Escuela Politécnica Nacional, Quito- Ecuador , pp. 1- 60.
 29. Theil, F.,1997,"Enzyme in der organischen Synthese", Spektrum Akademischer Verlag Gmb, Heidelberg-Berlin- Oxford, pp. 1-15, 17- 88, 235-237.
 30. Villarreal, L., Dhuique-Mayer, C.,Dornier, M., Ruales, J., y Reynes, M., 2003, "Évaluation del interés du Babaco (*Carica Pentagona Heilborni.*)", FRUITS, 58, 39-52.
 31. Ward, O., 1996,"ProteolyticEnzymes",pp. 789-814.
 32. White, A., Handler, P., Smith, E., Hill, R., y Lehman, I.,1983,"Principies of Biochemistry", 6th ed. McGraw-Hill. Wyman, J. pp 47-56.
 33. Wiseman, A.,1985, "Manual de Biotecnología de las Enzimas". Editorial Acribia, S.A., Zaragoza-España, pp. 49-60 y 269-281

ANEXOS

ANEXO A

Determinación de la actividad proteolítica del látex liofilizado

Para determinar la actividad proteolítica del látex liofilizado se realizó la titración con sosa según el método descrito anteriormente y se graficó la curva y se obtuvo donde de la ecuación cuadrática. El valor del coeficiente lineal, es la velocidad de reacción y después de procede a calcular la actividad proteolítica de acuerdo a la cantidad de látex liofilizado empleado en el experimento.

Se efectuaron por triplicado los experimentos para así obtener una actividad proteolítica promedio y su desviación promedio.

Tabla 20. Valores experimentales para la determinación de la actividad proteolítica

Tiempo(min)	Volumen(mL)
0	0,000
1	0,064
2	0,261
3	0,585
4	0,950
5	1,254
6	1,305
7	1,720
8	1,942
9	2,492
Vrx	0,1896
Act. Prot	5699,8557

De la Figura 25, se obtuvo la ecuación cuadrática y de ahí el coeficiente lineal, siendo este la velocidad de reacción de la muestra.

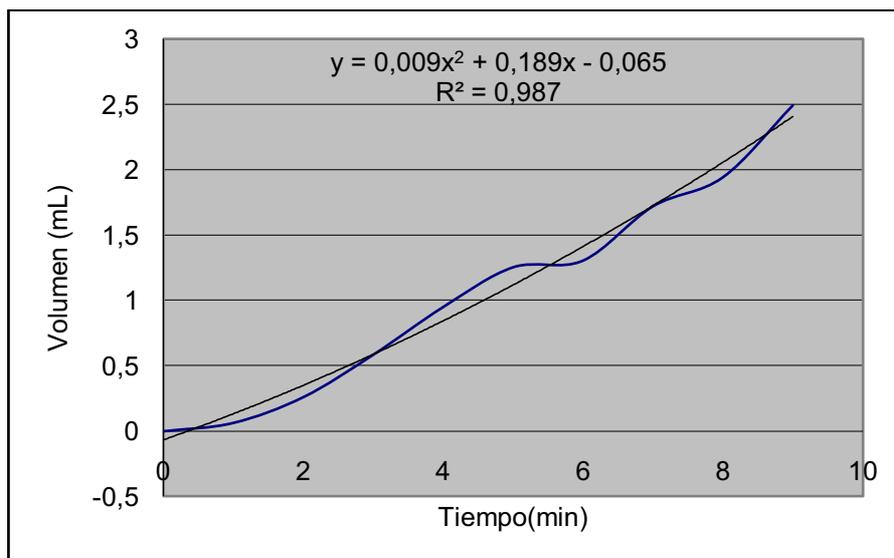


Figura 25. Titulación con sosa en el tiempo

Usando la ecuación 2, se realizó el cálculo de la actividad proteolítica de la muestra. Ejemplo a cálculo:

Peso muestra = 25 mg

Velocidad de reacción = 0,1896

Velocidad de reacción x 0,5 x 1000000

Act. Proteolítica (U/ g) =-----

Peso muestra (mg) x 0,66

Reemplazando los valores utilizados de muestra y el valor de velocidad de reacción en la Ec. 2 :

0,1896 x 0,5 x 1000000

Act. Proteolítica (U/ g) = -----

25 mg x 0,66

Act. Proteolítica (U/g) = 5699,8557

