



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

TEMA:

“MODIFICACIÓN ENZIMÁTICA DE LA FIBRA DIETARIA DE LA CÁSCARA DEL CACAO (*Teobroma cacao L*) variedad Complejo nacional por trinitario”.

Previo a la obtención del título de
Bioquímico Farmacéutico

AUTOR:

Paulina Ivanova Aguilar Cárdenas

DIRECTOR:

Ing. María Paulina Torres Castro

LOJA-ECUADOR

2011

CESIÓN DE DERECHOS

YO:

Paulina Ivanova Aguilar Cárdenas

Declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 67 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”.

Paulina Ivanova Aguilar Cárdenas.

Ing. María Paulina Torres Castro
DIRECTOR DE TESIS

CERTIFICACIÓN

Ing. María Paulina Torres Castro

DIRECTOR DE TESIS

CERTIFICA:

Que el presente trabajo investigativo “**MODIFICACIÓN ENZIMÁTICA DE LA FIBRA DIETARIA DE LA CÁSCARA DEL CACAO (*Teobroma cacao L.*) variedad Complejo nacional por trinitario**” de autoría de la Señorita Paulina Ivanova Aguilar Cárdenas, se realizó bajo mi dirección y control personal, cuyo contenido ha sido prolijamente revisado y corregido, por lo que autorizo su publicación y defensa.

Loja, Agosto del 2011

Ing. María Paulina Torres Castro

DIRECTOR

AUTORÍA

Las ideas, opiniones, criterios y recomendaciones plasmadas en el presente trabajo, son de exclusiva responsabilidad de la autora.

Paulina Ivanova Aguilar Cárdenas.

DEDICATORIA

A Miguel Ángel que aunque este en el cielo, siempre he sentido su mano sobre de la mía, a Miguel Ángel y Lidia Faviola mis padres, ejemplo de trabajo, sacrificio y entrega en el día a día porque gracias a ellos he podido culminar una etapa más de mi vida. A mi hermano Diego Fabián por su cariño y paciencia brindada, en especial a mi sobrinito que la dulce espera de su llegada motiva mis días. A todos mis familiares quienes siempre estuvieron a mi lado brindándome su apoyo y confianza.

Paulina Ivanova

AGRADECIMIENTO

Expreso mi inmensa gratitud a Dios por darme el día a día, a la Universidad Técnica Particular de Loja por abrirme las puertas de sus aulas para que pueda cumplir una de mis metas anheladas, al Centro de Transferencia de Tecnología e Investigación Agroindustrial, su Directora Ing. Ruth Martínez, por haber depositado en mí toda la confianza para la realización de este trabajo a los docentes investigadores por el apoyo brindado, especialmente a mi directora Ing. Paulina Torres Castro por sus conocimientos impartidos a lo largo de mi trabajo. Al Ing. Galo Vargas por su tutela y consejos.

A mis amigos y amigas por su brindarme su cariño y apoyo incondicional a lo largo de mi vida estudiantil.

Paulina Ivanova

INDICE DE CONTENIDOS

| | |
|---|------------|
| Cesión de derechos | i |
| Certificación | ii |
| Autoría | iii |
| Dedicatoria | iv |
| Agradecimiento | v |
| Índice de contenidos | vi |
| Lista de abreviaturas | ix |
| Resumen | x |
| Abstract | xi |
| Capítulo I Fin, Propósito y Objetivo | 02 |
| Capítulo II Introducción | 04 |
| Antecedentes | 08 |
| Capítulo III Metodología | 12 |
| 4.1 Materia prima | 13 |
| 4.2 Preparación de las muestras | 13 |
| 4.3 Composición proximal de la cáscara de cacao | 13 |
| 4.4 Enzimas utilizadas | 14 |
| 4.5 Tratamiento enzimático | 14 |
| 4.6 Cuantificación fibra dietaria total, fibra soluble y fibra insoluble | 15 |
| 4.7 Determinación de la actividad enzimática frente al sustrato | |
| Carboximetilcelulosa | 16 |
| 4.8 Análisis Estadístico | 16 |
| 4.9 Planteamiento de hipótesis | 17 |

| | |
|--|-----------|
| Capítulo IV Resultados y Análisis | 19 |
| Capítulo V Conclusiones | 29 |
| Capítulo VI Recomendaciones | 31 |
| Anexo | 32 |

INDICE DE TABLA

| | |
|---|-----------|
| Tabla 1. Composición proximal (%B.S) de los residuos del cacao | 19 |
| Tabla 2. Contenido de fibra dietaria en residuo de cacao | 20 |
| Tabla 3. Balance de FDI/FDS en residuo de cacao luego de aplicar tratamientos enzimáticos en el sector Cone | 21 |
| Tabla.4. Balance de FDI/FDS en residuo de cacao luego de aplicar tratamientos enzimáticos en el sector Taura | 22 |
| Tabla 5. Análisis de varianza para FDI/FDS | 24 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|-----------|
| Figura 1. Interacciones dobles para la variable respuesta FDI/FDS en el sector Cone y Taura | 25 |
| Figura 2. Interacciones de los efectos principales para la variable respuesta FDI/FDS | 26 |

INDICE DE ANEXOS

| | |
|--|-----------|
| Anexo 1: | |
| Diagramas | 33 |
| Diagrama 1. Actividad Enzimática | 33 |
| Diagrama 2. Tratamiento Enzimático | 43 |
| Diagrama 3. Determinación de fibra dietaria soluble e insoluble según el Método AOAC 991.43 | 44 |
| ANEXO 2: | |
| Fichas técnicas de enzimas | 45 |



Enzymatic modification of dietary fibre of cacao husk.

María P.Torres^a * Paulina I. Aguilar

Centro de Transferencia de Tecnología e Investigación (CETTIA)

Universidad Técnica Particular de Loja

San Cayetano alto, calle Marcelino Champagnat, s/n

Código Postal .1101608

Loja, Ecuador

mptorres@utpl.edu.ec

pivanova@hotmail.es



Abstract

In the present work we found how to modify the balance insoluble and soluble fiber IDF/SDF (18, 44:1; 27, 2:1) of cacao husk from Taura and Cone sectors with enzymatic treatment. We used three enzymes: cellulase, hemicellulase and enzymatic complex viscozyme with following volumes: 200, 400, 600.800, 1000, 1200 μ l. The analytical protocol for the enzymatic treatment is a modification of the methodology used by Malkki and Myllymäki *et al* (1998). Enzymatically treated samples the amount of soluble and insoluble dietary fiber was determined according to the Enzymatic-Gravimetric method based on AOAC 991.43 and AACC32-07 methods. Through the statistical analysis the optimal treatment was established in 1200 and 800 μ l of enzymatic complex viscozyme in Cone and Taura sectors obtaining a IDF/SDF balance of 4,94:1 and 5,91:1. respectively.

Keywords: cacao husk, enzymatic modification, FDI / FDS.

1. Introduction

With the name of dietary fibre group a serie of substances of vegetable source not digestible are grouped by enzymes in the human body. Dietary fibre is classified as insoluble fibre and soluble fibre based on their physical properties and physiological effect on the body.

Soluble fibre includes gums and mucilage pectin that lower cholesterol levels in blood, low insulin and blood glucose can combine with bile acids, and slow gastric emptying (Miranda, 2000).

Insoluble fibre is mainly cellulose, hemicellulose and lignin, this type of fiber found in wheat bran, whole grains and vegetables whose function is to trap water and because of that increase stool weight, they can sequester minerals and affect fecal steroids (Miranda, 2000).

The resources most used as a source of dietary fibre in food technology are the cereals. In spite that fibres from vegetables and fruits are less studied, they are considered in general as they have the best nutritional and technology quality and better nutritional quality and technology (Torres et al 2010). Actually there is the tendency to study new sources to obtain dietary fibre

^a Corresponding author.Tel.:250275;ext 2518
E-mail:mptorres@utpl.edu.ec.

of raw materials that are not used in food as residues sub products from farming food (Pérez et al 1997).

Cocoa husk has a balance of IDF / SDF of 18,4: 1 and 13,2:1 in Taura and Cone sectors being good sources of insoluble dietary fibre (Abarca et al 2010). The balance between fractions of a resource of dietary fibre is very important because from it will depend the nutritional and functional effects in the body (Figuerola et al 2005; Sanchez, 2008).

In terms of benefit for health, daily consumes should provide a relation of IDF / SDF equal to 3:1 (Guzman *et al* 2006). Fiber resources are classified according to their relation IDF/ SDF as excellent (50:50) and good (70:30) to be used as ingredient in processed foods. (Figuerola *et al* 2005).

Enzymatic modification offers the possibility of improving functional and sensory properties of vegetable products, increasing the amount of soluble dietary fibre , through a combination of enzymes that will be able to get around indigestible compounds and to obtain a product that will be a source of fibre and it will be used in food (Dreher, 2001).

The application of enzymes at specific condition as : time, temperature, and pH depending on the nature of the fiber and enzyme, that results in degradation or indigestible compounds such as proteins, starches, simple sugars, thus changing the content and composition (Dreher, 2001) and functional properties of dietary fibre (Meyer *et al* 2009).

The objective of this study was to produce partial degradation of components (cellulose, hemicellulose, and lignin) of cacao husk (Dreher, 2001) modifying its balance IDF / SDF.

2. Materials and Methods

TRANSMAR Company proved the cocoa beans, (*Teobroma cacao* L.) from Complejo nacional trinitario variety from Taura and Cone sectors from Guayas province. The benefit of samples was made in Food Laboratory (CETTIA). The husk from the beans was the raw material of this investigation.

2.1. Proximate composition of cacao husk

The following methods were used:

Analysis of fat: AOAC METHOD 954.02

Analysis of humidity: AOAC METHOD 934.16

Analysis of raw protein : AOAC METHOD 920.152

Analysis of ash : AOAC METHOD 942.05

Analysis of raw fibre : AOAC METHOD 978.10

Analysis of extract free of nitrogen: AOAC METHOD 986.25.

2.2. Enzyme Source

Three enzymes were used: Cellulase (activity ≥ 3 U/mg), Hemicellulase (activity 0,3-3,0 U/mg), both derivated from *Aspergillus niger* and Viscozyme® expressed as 100 FBG/g (Fungal Beta Glucanase) (Sigma, 2006).

2.3. Enzymatic Treatment

Malkki *et al* Method was used, (1998) and enzymatic treatment consisted of applying to a dried cacao husk (<10% humidity) and particle size (200-600 microns) with a volume of enzymes under specific

conditions of time, temperature and pH according to technique card of each enzyme. Food-grade reagents were used.

6 gr of dried residue were weighed and were added 120 ml phosphate-citrate buffer in function to pH of the enzyme to be used, in the case of hemicellulase and viscozyme the pH was of 4.5 and pH of 5 for cellulase to concentrations of 200, 400, 600, 800, 1000, 1200 µl by triplicate.

Activation of enzymes was with cellulose at 37°C by 2h, hemicellulase at 40°C by 2h and 45°C viscozyme by 4h.

The inactivation of enzymes was made at 90 °C by 5 minutes and it was added 4 volumes of ethanol (480ml) in each sample for fibre precipitation. We placed in tubes to centrifuge at 1000 rpm by 15 minutes, supernatant was removed and solid fractions were placed in a porcelain capsule to be dried at 60°C with humidity below 10%.

Finally samples were crushed and stored them in ziploc bags.

2.4. Determination of total, soluble, and insoluble dietary fibre.

The procedure we followed was from Megazyme prospectus based on Prosky method (AOAC 991.43, and AACC 32-07) (Sanchez, 2008).

2.5. Determination of enzyme activity in front of carboxymethylcellulose substrate (CMC).

The enzymatic activity of each enzyme was standardized in front of carboxymethylcellulose standard substrate (CMC), through estimation of reducing sugars by dinitrosalicylic acid method (DNS) IUPAC (Ghose, 1987). The enzymatic activity was obtained in international units (IU) per ml of solution.

2.6. Statistical analysis.

Factorial design 6x3x2 was used, as variable response it was evaluated IDF/SDF balance that was obtained from each treatment.

The factors studied were: type of enzyme (cellulase, hemicellulase, viscozyme[®] L) volume of enzyme solution (200, 400, 600, 800, 1000 and 1200 µl) and two sectors Taura and Cone (Dreher, 2001; Mejia *et al*, 2007) each test with three replicates.

The analysis of results was performed using the statistical package Minitab[®] Statistical Software, version 14.

3. Results and Discussion

The results showed (Table 1) that Taura sector had a 5% more of crude fibre (CF) than Cone sector. The content of fiber depends on the maturation of plants because these suffer physiological changes such as accumulation of cellulose and other complex carbohydrates, these tissues get around to be linked through a process known as lignification. Consequently, as the plant gets older its content of fiber increases. (Hoffman *et al*, 2007).

Cone sector has a 3% more of extract free of nitrogen (NFE) within this parameter are carbohydrates free of cellulose such as: starch, reducing sugars, hemicelluloses, gums, and part of lignin, all of them very digestible. Vegetable products that contain more nitrogen-free extract contain low raw fiber (Cheftel, 1989).

Comparing results, Cone sector had more amount of extract free of nitrogen and less quantity of raw fiber respectively (Table 1).

Table 1**Proximal Composition (% dried Base.) of cacao husk.**

| | SECTOR | ASH | PROTEIN | FAT | CRUDE FIBRE | NITROGEN-FREE EXTRACT |
|------------|--------|-------|---------|------|-------------|-----------------------|
| CACAO PEEL | Taura | 10,87 | 8,04 | 2,03 | 36,01 | 43,03 |
| | Cone | 11,22 | 7,99 | 2,74 | 31,05 | 46,01 |

Source: The author

Table 2**Content of dietary fibre in cacao husk.**

| WASTE | SECTOR | Total dietary fibre TDF | Insoluble dietary fibre IDF | Soluble dietary fibre SDF | Ratio IDF/SDF |
|------------|--------|-------------------------|-----------------------------|---------------------------|---------------|
| Cacao peel | TAURA | 59,90% | 56,82% | 3,08% | 18,44:1 |
| | CONE | 66,57% | 64,06% | 2,35% | 27,2:1 |

Source: The author

Cone Sector presents a 6,67% and 7,2% more of *total dietary fiber* (FDT), and insoluble dietary fiber (FDI) than Taura Sector (Table 2). The difference of dietary fiber content between both places is due to different factors: differences of growing conditions of plants, age of fields and environment factor, this last is affecting significantly bio chemic bean's components (Sanchez, 2008).

The age of these fields from Cone and Taura was probably the reason for the difference of content of fiber of them, a plan reaches its maximum production at the age of 20 years and diminishes gradually until being considered not rentable at the age of 60; also the percentage of cellulose and lignin increase with ripening (Izquierdo, 2008).

Comparing the dietary fiber contribution of two sectors of study we observed that the relation of IDF / SDT in cocoa husk does not carry out the conditions of excellent (50:50) neither appropriate (70:30) to be used as an ingredient in

processed foods (Figuerola et al, 2005) (Table 2).

The residue of cacao in two sectors show similar values to pineapple husk which has a relation of 22,63:1 these can not be used in nutritious formulas (Baquero *et al*, 2006).

The application of three enzymes: cellulose, hemicelluloses and enzymatic viscozyme complex modified IDF/SDF balance (Table 3 and 4).

Consequently Taura Cone sectors had the maximum decrease of insoluble dietary fibre (IDF) and the greater increase in soluble dietary fibre (SDF) was with 1200 µl of viscozyme.

The low efficiency of cellulase and hemicellulase on cocoa husk was due to these enzymes are very specific to the substrate where it acts because they only hydrolyzed cellulose and hemicellulose and compounds which form part of soluble fiber were trapped, and therefore there was no change among the soluble and insoluble fractions. (Casanova, 1997; Codex, 2009).

The lowest balance of IDF/SDF was obtained with enzymatic viscozyme complex in Cone sector (4,95:1). Comparing this result with wheat bran which is a major source of fiber used in food industry with relation IDS /SDF of 24:1 resulted that cacao husk after being applied enzymatic treatment has a better balance than the bran wheat, and it can be considered as a good source of dietary fiber and be used as an ingredient in food formulation (Sanchez, 2008., Figuerola *et al*, 2005).

Table 3**Balance of IDF/SDF in cacao residue after applying enzymatic treatment in Cone sector.**

| Cone Sector | 200 µl | | 400 µl | | 600 µl | | 800 µl | | 1000 µl | | 1200 µl | |
|---------------|----------|------|---------|------|---------|------|---------|-------|---------|-------|---------|-------|
| | IDF/SDF | | IDF/SDF | | IDF/SDF | | IDF/SDF | | IDF/SDF | | IDF/SDF | |
| | IDF | SDF | IDF | SDF | IDF | SDF | IDF | SDF | IDF | SDF | IDF | SDF |
| CELLULASE | 11,26 :1 | | 11,00:1 | | 10,77:1 | | 9,28:1 | | 8,01:1 | | 7,95:1 | |
| | 59,6 | 5,30 | 59,51 | 5,41 | 59,40 | 5,52 | 58,61 | 6,31 | 58,60 | 6,32 | 58,53 | 6,31 |
| HEMICELLULASE | 11,27:1 | | 11,01:1 | | 10,84:1 | | 10,74:1 | | 10,74:1 | | 10,72:1 | |
| | 59,63 | 5,29 | 59,52 | 5,40 | 59,40 | 5,52 | 59,39 | 5,53 | 59,39 | 5,53 | 59,46 | 5,56 |
| VISCOZYME | 10,74:1 | | 9,75:1 | | 9,19:1 | | 5,84:1 | | 4,95:1 | | 4,94:1 | |
| | 59,39 | 5,53 | 58,88 | 6,04 | 58,55 | 6,37 | 54,01 | 10,91 | 54,01 | 10,91 | 53,98 | 10,91 |

Source: The author

Table 4.**Balance of IDF/SDF in cacao residue after applying enzymatic treatment in Taura sector.**

| Taura Sector | 200 µl | | 400 µl | | 600 µl | | 800 µl | | 1000 µl | | 1200 µl | |
|---------------|----------|------|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|
| | IDF/SDF | | IDF/SDF | | IDF/SDF | | IDF/SDF | | IDF/SDF | | IDF/SDF | |
| | IDF | SDF | IDF | SDF | IDF | SDF | IDF | SDF | IDF | SDF | IDF | SDF |
| CELLULASE | 17,73 :1 | | 11,00:1 | | 8,29:1 | | 9,28:1 | | 8,29:1 | | 8,25:1 | |
| | 60,6 | 3,43 | 60,01 | 3,64 | 59,99 | 4,10 | 57,19 | 6,89 | 57,19 | 6,89 | 57,20 | 6,88 |
| HEMICELLULASE | 17,80:1 | | 16,61:1 | | 16,20:1 | | 16,21:1 | | 16,21:1 | | 16,21:1 | |
| | 60,88 | 3,40 | 60,45 | 3,64 | 60,33 | 3,73 | 60,36 | 3,72 | 60,36 | 3,72 | 60,36 | 3,73 |
| VISCOZYME | 16,54:1 | | 14,17:1 | | 10,38:1 | | 5,96:1 | | 5,91:1 | | 5,91:1 | |
| | 60,44 | 3,65 | 59,86 | 4,23 | 58,45 | 5,63 | 54,88 | 9,20 | 54,80 | 9,26 | 54,80 | 9,26 |

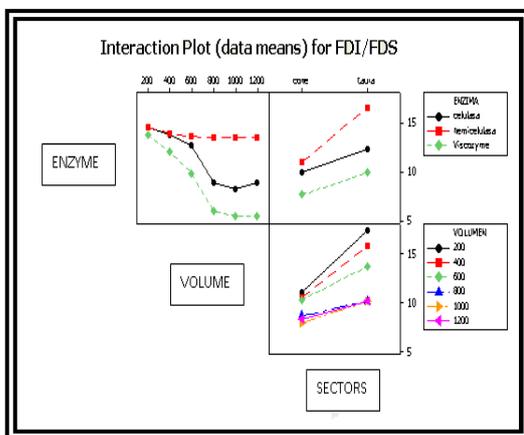
Source: The author

In this investigation the content of initial soluble dietary fiber increased four times in Cone sector and three times in Taura sector using viscozyme enzyme, the results are satisfactory if they are compared with enzymatic modification made on wheat by Nam (1990) which content of initial FDS increased two times, using hemicellulasa.

The efficiency of the enzymatic viscozyme complex on cacao husk to improve the balance of IDF/ SDF was due to this is a mixture of arabinase, cellulose, B-glucanase, hemicellulase, xylanase, pectinase and pentosanase, especially effective in breaking cell walls in a process of hydrolysis releasing compounds that are part of the soluble fiber (glucose, arabinose, xylose, galactose) that are easier to metabolize (Salinas *et al*, 2003).

Figure 1

Interactions of main effects for variable response IDF / SDS.



The type of enzyme, volume and location of samples are factors that significantly affect enzymatic improvement (Figure 1). Comparing the three types of enzyme cellulase, hemicellulase and viscozyme this latter is more efficient to act on the substrate from cacao husk, results that are evidenced in Fig. 1 and Table (3 and 4) (Salinas *et al*, 2003., Montgomery *et al*, 1996)

The most appropriate volume of enzyme for modifying the relation of FDI/FDS was with enzymatic viscozyme volumes of 800, 1000, 1200 µl that are seen in results in Fig. 2 and Table 3, where the concentration of 1200 µl was the treatment for the Cone sector (Figuerola, 2005). Therefore industrially it can be used 800 µl of enzyme viscozyme by each 6 gr of sample because there is not significant difference with volumes of 1000 and 1200 µl in relation IDF/SDF.

5. Conclusions and Recommendations

5.1 Conclusions

The enzymatic complex modified the balance of IDF/SDT in Cone sector of 27,2:1 to 4,94:1 and in Taura sector of 18,44:1 to 5,91:1 it was not possible to get a good balance between soluble and insoluble fractions of 3:1.

The best enzymatic treatment was in Cone sector with viscozyme 1200 µl, and 800 µl for Taura sector.

The place of origin of samples also influenced in the content of relation of IDF /SDF, Cone sector which was treated in an enzymatic way presented a better relation between soluble and insoluble fibre in Taura sector.

5.2. Recommendations

To determine if phenolic compounds which are associated to antioxidant capacity that cacao residue has are affected after applying enzymatic treatments.

To make a fractionation of soluble and insoluble dietary fibre and to verify which compounds are found in greater amounts after applying enzymatic treatments

6. Gratitude

My great sincere thanks to the staff of microbiology laboratory of food (CETTIA), for given supporting this investigation.

7. References

- Abarca, D.** (2010) "Identificación de la fibra dietaria en residuos de cacao (Theobroma cacao L.) VARIEDAD Complejo nacional por trinitario". Escuela de Industrias Agropecuarias, Tesis, CETTIA. Loja -Ecuador: 1-59.
- Baquero, C., Bermúdez, A.** (2006). "Los residuos vegetales en la industria de jugo de maracuyá como fuente de fibra dietaria." Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia. : 207-214.
- Casanovas J.R.** (1997) Nuevo producto de fibra de cacao a base de cáscara de cacao tostada, in: S. A. Moner y Llacuna (Ed.), Oficina Española de Patentes y Marcas, España.
- Codex.** (2009).Codex-Hemicelulasas. "Especificaciones de los productos enológicos". RESOLUCIÓN OIV:1-8.
- Cheftel, H.** (1989). "Introducción a la Bioquímica y tecnología de alimentos.
- Dreher , M. L.** (2001). Dietary Fiber Overview. Handbook of Dietary Fiber. S. Sungsoo.
- Figuerola, F** (2005). "Fibre concentrates from Apple pomace and citrus peel as potencial fibre sources for food enrichment." Facultad de Ciencias Agrarias de Chile, Instituto de ciencias y Tecnología de alimentos (37096646).
- Ghose, T., K,** (1987). Measurement of Cellulase Activities Applied Chemistry Division Commission on Biotechnology. I. U. o. P.a. A. Chemistry. New Delhi-110016, India Indian Institute of Tecnology 11.
- Guzmán, Ernesto.** 2006. Fibra dietética / Solo beneficios para nuestro organismo.Nutrición 21. 15:34. <http://www.inta.cl/revista/NutriXXI-15.pdf>
- Hoffman, K.,** Lundberg, L.,Randy, D.,Shaver,F. (2007). "El Efecto de la Madurez en la Digestibilidad del FDN (Fibra Detergente Neutro)." University of Wisconsin-Madison 4 UW-Madison, Department of Agronomy. 5: 1-2.
- Izquierdo, L.** (2008) Información TRANSMAR Ecuador, Guayaquil.
- Malkki, Y., O,Myllymaki.** (1998). "Method for enriching soluble dietary fibre.US005846590A.Finlandia." 1: 5.
- Mejía, G.,** Martínez Correa., Betancourt C. (2007). "Aprovechamiento del residuo agroindustrial del mango común (Mangifera indica L.) en la obtención de azúcares fermentables". Ingeniería y Ciencia, Volumen: 3, 41-62.
- Meyer, Anne S.;** Dam, Birgitte, P. and Laerke, Helle N. 2009. Enzymatic solubilization of a pectinaceous dietary fiber fraction from potato pulp: optimization of the fiber extraction process. Biochemical Engineering Journal. 43(1):106-112.
- Miranda, Álvaro.** (2006). LA FIBRA DIETARIA EN LA NUTRICIÓN (Profesor investigador Facultad de Medicina UAEMEX).
- Montgomery, D., G,** Runger. (1996). "Probabilidad y estadística aplicadas a la ingeniería.McGraw Hill."
- Nam,Y.,** Grundleger,L. 1990. Improvement in soluble fiber content of wheat fiber through enzymatic modification. Journal of Agricultural andFood Chemistry. 38(4):1142-1145.
- Pérez-Hidalgo, M.;** Guerra-Hernández, E. and García-Villanova, B. 1997. Determination of insoluble dietary fiber compounds: cellulose, hemicellulose and lignin in legumes. Ars Pharmaceutica. 38(4):357-364.
- Torres, M. P.,** Vargas, G. (2010). "Modificación enzimática de la fibra dietaria del pergamino de café (Coffea arabica L.)." Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos 2: 262-271.
- Sánchez, B. S.** (2008). Caracterización Físicoquímica y Funcional de la Fibra Dietética del Fruto del Nispero (*Eriobotrya japonica*) y de la Cascara de Mango (*Mangifera indica* l). Instituto de Agroindustrias Oaxaca, Universidad

Tecnológica de las Mixteca. Ingeniero en alimentos: 76.

Salinas, J., Pérez, A. (2003.). "Procedimiento para preparar piensos para acuicultura." OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES.

Sigma-Aldrich. 2006. Enzymes for Cell Dissociation and Lysis.**2:2-18.**

Lista de Abreviaturas.

| | |
|-------------|------------------------------------|
| °C | Grados Celsius |
| b.s. | Base seca |
| ELN | Extracto Libre de Nitrógeno |
| FC | Fibra Cruda |
| FD | Fibra Dietaria |
| FDI | Fibra Dietaria Insoluble |
| FDS | Fibra Dietaria Soluble |
| FDT | Fibra Dietaria Total |
| t | Tonelada |
| g | Gramos |
| ml | Mililitros |
| min | Minutos |
| pH | Potencial de hidrógeno |
| rpm | Revoluciones por minuto |

RESUMEN

El presente trabajo buscó modificar el balance de fibra dietaria insoluble / fibra dietaria soluble (FDI/FDS) en cáscara de cacao de los sector Taura y Cone mediante tratamiento enzimático. Se trabajó con tres enzimas: celulasa, hemicelulasa y un complejo enzimático viscozyme con volúmenes de 200, 400, 600,800, 1000, 1200 μ l. El protocolo analítico para el tratamiento enzimático es una modificación de la metodología empleada por Malkki and Myllymaki *et al.* (1998). En las muestras tratadas enzimáticamente se determinó el contenido de fibra dietaria soluble e insoluble según el método Enzimático Gravimétrico basado en los métodos AOAC 991.43 Y AACC32-07. Mediante análisis estadístico se estableció que el tratamiento óptimo fue con el complejo enzimático viscozyme 1200 μ l para el sector Cone y 800 μ l para el sector Taura obteniéndose un balance de FDI/FDS de 4,94:1 y 5,91:1 respectivamente.

Palabras claves: cáscara de cacao, modificación enzimática, FDI/FDS.

ABSTRACT

In the present work we found how to modify the balance insoluble and soluble fiber (IDF/SDF) of cacao husk from Taura and Cone sectors with enzymatic treatment. We used three enzymes: cellulase, hemicellulase and enzymatic complex viscozyme with following volumes: 200, 400, 600.800, 1000, 1200 μ l. The analytical protocol for the enzymatic treatment is a modification of the methodology used by Malkki and Myllymäki *et al* (1998). Enzymatically treated samples the amount of soluble and insoluble dietary fiber was determined according to the Enzymatic-Gravimetric method based on AOAC 991.43 and AACC32-07 methods. Through the statistical analysis the optimal treatment was established in 1200 and 800 μ l of enzymatic complex viscozyme in Cone and Taura sectors obtaining a IDF/SDF balance of 4,94:1 and 5,91:1. respectively.

Keywords: cacao husk, enzymatic modification, IDF /SDF.

CAPITULO I

1. FIN

- **Optimizar los efectos funcionales, fisiológicos y prebióticos de las fracciones de fibra presente en los residuos agroindustriales.**

1.1. PROPOSITO

- Mejorar el balance FDI/FDS de la fibra dietaria de la cáscara del cacao (*Teobroma cacao L.*) variedad Complejo nacional por trinitario, aplicando tratamiento enzimático.

1.1.1. OBJETIVO

- “Modificar enzimáticamente la fibra dietaria de la cáscara del cacao (*Teobroma cacao L.*) variedad Complejo nacional por trinitario”

CAPITULO II

2. INTRODUCCIÓN.

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es uno de los productos de la industria alimenticia de origen tropical de mayor productividad en el mercado internacional, sus exportaciones en grano han representado más de 71% de volumen producido, situación derivada del alto valor agregado provocado por la industria del chocolate y sus derivados.¹

Existen algunas variedades de cacao, pero las usadas en los cultivos ecuatorianos son: el "Nacional" este posee un sabor y aroma característico, que son muy apreciados por las industrias del todo el mundo y el cacao Trinitario (variedad CCN51) presenta características de alta producción y tolerancia a las enfermedades pero no tiene el aroma que posee el Nacional.²

La producción de cacao en el Ecuador ha constituido una importante actividad para la economía nacional, en especial por su significativa contribución a la generación de divisas por concepto de exportación. En la actualidad ocupa el tercer lugar en el monto de exportaciones del sector agrícola, después del banano y de las flores.²

La producción anual del cacao en nuestro país fluctúa dentro de un rango de 80 000 a 90 000 t en donde sólo se aprovecha económicamente la semilla, y los desechos generados están constituidos en su mayoría por la cáscara.¹

- (1) **Barazarte**, H., Sangronis, E., Unai, E. (2008). "La cáscara de cacao (*Theobroma cacao* L.): una posible fuente comercial de pectinas." Archivos Latinoamericanos nutrición. DE Órgano Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición. Universidad Simón Bolívar. Laboratorio de Análisis de Alimentos. Dpto. de Procesos Biológicos y Bioquímicos. Universidad Central de Venezuela. Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Caracas, Venezuela **58**: 64-70
- (2) **CORPEI** (1999). "Reactivación de la producción y mejora de la calidad del cacao." Estimación del Proyecto ECU-B7: 3-19.

En Ecuador, es TRANSMAR la segunda empresa exportadora de cacao fino de aroma que generan anualmente 12 000 t /año de residuos, siendo la cáscara de cacao la que ocupa un 80% de estos residuos seguida de la cascarilla que resulta de la apertura del grano seco de cacao.³

La utilización de residuos agroindustriales viene siendo materia de investigación para la producción de compuestos con alto valor agregado, ya que puede ser el punto de partida para la mejor utilización de los recursos y disminución de la contaminación ambiental generada por las industrias.⁴ Esto ha motivado el desarrollo de estudios con la finalidad de aumentar el valor comercial y diversificar el uso de las cáscaras de cacao, cuyo aprovechamiento tradicional es como insumo para la alimentación animal y la recuperación de suelos.^{5 6}

La fibra de cacao podría constituir un ingrediente funcional con un papel activo en el mantenimiento de la salud humana y en la prevención de enfermedades con elevadas tasas de incidencia en la sociedad.

Entre las recomendaciones específicas para mantener el estado de salud del ser humano está el incrementar el consumo de alimentos que contengan fibra dietaria, ya que esta puede prevenir algunas enfermedades de tipo coronario además del cáncer y la obesidad.⁸

Con el nombre de fibra dietaria se agrupa a una serie de sustancias de origen vegetal, no digeribles por enzimas propias del organismo humano. La fibra dietaria se clasifica en fibra insoluble y fibra soluble con base en sus propiedades físicas y su efecto fisiológico en el organismo.⁹

- (3) **Ramírez P.** (2006) Estructura y Dinámica de la Cadena de Cacao en el Ecuador: Sistematización de Información y Procesos en Marcha, Ecuador Cacao Arriba, Quito. pp. 72.
- (4) **Mejía, G.,** Martínez Correa., Betancourt C. (2007). Aprovechamiento del residuo agroindustrial del mango común (*Mangifera indica* L.) en la obtención de azúcares fermentables. Ingeniería y Ciencia, Volumen: 3, 41-62.
- (5) **López, AS.,** Ferreira H., Llamosas A., Romeu A. Present status of cacao by products utilization in Brazil. Rev. Theobroma 1984; 14(4): 271-29.

La fibra insoluble consiste principalmente en celulosa, hemicelulosa y lignina, este tipo de fibra se encuentra en el salvado de trigo, granos integrales, verduras y tienen como función atrapar agua, por tanto incrementan el peso de las heces, pueden secuestrar minerales trazas y afectan los esteroides fecales. La fibra soluble comprende gomas, pectinas y mucílagos que bajan los niveles de colesterol sanguíneo, bajan la insulinemia, glucemia, uniéndose a ácidos biliares y retardando el vaciamiento gástrico.⁹

De acuerdo a la American Dietetic Association, nuestro cuerpo necesita fibra para su buen funcionamiento, debemos consumir de 20-35 gramos de fibra al día. La manera más sana de consumir fibra es de los alimentos, siendo ellos los más eficientes para proporcionarnos nutrientes.¹⁰

En el proyecto "Identificación de fibra dietaria en residuos de cacao" desarrollado en el CETTIA, se obtuvo que la cáscara de cacao tiene un contenido de 64,54% de fibra dietaria total (FDT), 4,02% de fibra dietaria soluble (FDS), y 60,22% de fibra dietaria insoluble (FDI), con un balance de FDI/FDS igual a: 18,4:1 y 13,2:1 en los sitios de Taura y Cone respectivamente.⁶

- (6) **Abarca, D.**(2010) "Identificación de la fibra dietaria en residuos de cacao (Teobroma cacao L.) VARIEDAD Complejo nacional por trinitario". Escuela de Industrias Agropecuarias, Tesis, CETTIA. Loja -Ecuador: 1-59.
- (7) **Lecumberri, E., Mateos, R., Ramos, S., Alía, M., Goya, L.** (2006). "Caracterización de la fibra y su efecto sobre la capacidad antioxidante en suero de experimentación." Nutrición Hospitalaria. 5: 622-6228.
- (8) **Milo, L.** (2004) Nutraceutica Functional Food. Food Technology 58(2):71-75.
- (9) **Miranda, Álvaro.** (2006). LA fibra dietaria en la nutrición (Profesor investigador Facultad de Medicina UAEMEX).
- (10) **Rayas Duarte, P., Romero Baranzin, Ana Lourdes.** (2008). "Fibra base de frutas vegetales y cereales: función de salud." REVISTA MEXICANA DE AGRONEGOCIOS23: 9.

Las fuentes de fibra son calificados de acuerdo a su relación fibra dietaria insoluble/fibra dietaria soluble como excelente (1:1) y adecuado (2,3:1) para ser usado como ingrediente en alimentos procesados.¹¹

En el “Handbook of Dietary Fiber” indica que el contenido y la composición química de la fibra dietaria, pueden ser modificados mediante la eliminación de compuestos digeribles como: proteínas, almidones y azúcares simples cambiando su contenido y alterando las propiedades físico-químicas mediante ataque enzimático.^{2 13}

La modificación enzimática ofrece la posibilidad de mejorar las propiedades funcionales y sensoriales de productos vegetales, incrementando el contenido de fibra dietaria, mediante la combinación de enzimas que sean capaces de llegar a compuestos indigeribles y llegar a obtener un producto que sea fuente de fibra y sea usado en la alimentación.¹²

Por tal motivo el CETTIA ha planteado la presente investigación con la finalidad de mejorar con tratamiento enzimático el balance FDI/FDS en la cáscara de cacao, para de esta manera ampliar los usos de este residuo que para la Empresa TRANSMAR lo utilizan en un 5% como ingrediente en la formulación de abono orgánico de gran calidad para fertilizar los suelos de las plantaciones de cacao.¹⁴

(11) **Figuerola, F.** (2005). “Fibres concentrates from Apple pomace and citrus peel as potencial fibres sources for food enrichment. ”Facultad de Ciencias Agrarias de Chile, Instituto de ciencias y Tecnología de alimentos (37096646).

(12) **Dreher** , M. L. (2001). Dietary Fiber Overview. Handbook of Dietary Fiber. S.Sungsoo.

(13) **Malkki,Y.,Myllymaki,O.** (1998). "Method for enriching soluble dietary fibre"1:5.

(14) **Izquierdo,** L. (2008) Información TRANSMAR Ecuador, Guayaquil.

3. ANTECEDENTES.

El cacao, ampliamente utilizado en la industria agroalimentaria es una excelente fuente de fibra dietaria, pues contiene hasta un 12% de fibra y puede constituir un ingrediente funcional con un papel activo en la prevención de determinadas enfermedades con elevadas tasas de incidencia en las sociedades actuales, como las enfermedades cardiovasculares o el cáncer.⁷

Las dos características principales que contribuirían en mayor medida a este papel saludable serían, presumiblemente, su elevado contenido en FD y una elevada capacidad antioxidante derivada de su contenido en compuestos fenólicos.⁷

La cáscara de cacao posee varias cualidades: buen poder de absorción y retención de agua, tiene un alto contenido de grupos OH provenientes de la lignina, celulosa y es altamente biodegradable razón por la cual en México la usaron en la elaboración de espumas de poliuretano (PU) en la horticultura dándole otro tipo de uso, ya que en este país solo ha sido usado en la alimentación de ganado.¹⁵

La aplicación de enzimas en condiciones específicas de tiempo, temperatura y pH, en función de la naturaleza de la fibra y enzima, produce la degradación y remoción de compuestos digeribles cambiando así el contenido en su composición.¹¹

(7) **Lecumberri**, E., Mateos, R., Ramos, S., Alía, M., Goya, L. (2006). "Caracterización de la fibra y su efecto sobre la capacidad antioxidante en suero de experimentación." Nutrición Hospitalaria. 5: 622-6228.

(15) **Padrón**, G., Arias, E., García, J., Benavides, A. (2004). "Efecto de la cáscara de cacao en la obtención de espumas de poliuretano para uso hortícola. Propiedades físicas y de la biodegradabilidad " Soc.Quim**48**: 156-164.

Las enzimas celulasas son producidas por microorganismos de origen fúngico y bacteriano entre ellos *Aspergillus niger* que contiene actividad celulolítica (endo- β -1,4 -glucanasa, exo- β -1,4 -glucanasa). Este tipo de enzima es una mezcla de enzimas con una alta actividad sobre la celulosa y hemicelulosa, que degrada la celulosa manosas, xilanos, galactomanosas, pectinas, y otros polisacáridos. Esta enzima se activa a pH de 5, temperatura de 37°C por 2 horas, según la ficha técnica de la enzima.¹⁶

Hemicelulasa de *Aspergillus niger* no se encuentra en estado puro, sino que están presentes dentro de un complejo enzimático. Las preparaciones enzimáticas que contienen estas actividades proceden de fermentaciones dirigidas de *Aspergillus niger* y/o de mezcla de *Aspergillus niger* – *Trichoderma reesei*.¹⁷ Esta enzima cataliza la degradación de las hemicelulosas (galactanos, xiloglucanos, arabinoxilanos glucuronoarabinoxilanos, mananos, glucomananos) que están presentes en las paredes celulares de las plantas.¹⁸ Esta enzima se activa a un pH de 4.5 con una temperatura de 40°C por 2 horas, según la ficha técnica de la enzima.¹⁶

Viscozyme es una enzima 1,3 (4) Beta-endoglucanasa constituida por un conjunto de carbohidrasas tales como arabinasa, celulosa, B-glucanasa, hemicelulosa, xilanasa, pectinasa y pentosanasa, especialmente eficientes en la rotura de paredes celulares. La actividad de las B-endoglucanasas y celulosa se ve limitada por la presencia de enlaces covalentes de iones calcio entre las micro fibrillas de celulosa que interrumpen su hidrólisis.¹⁹

(16) **Sigma-Aldrich**. 2006. Enzymes for Cell Dissociation and Lysis.2:2-18.

(17) **Castellucci**, F. (2009). "CODEX -HEMICELULASAS." Codex Enológico Internacional.: 1-8.

(18) **Osorio**, J. H., Carmona, J., Uribe, L. (2008). DEGRADACIÓN de lípidos de la dieta por los equinos, ventajas y desventajas del tubo digestivo mixto." Biosalud7: 91-105.

(19) **Salinas**, J., Pérez, A. (2003.). "Procedimiento para preparar piensos para acuicultura."

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES.

El protocolo de Malkki and Myllymaki para enriquecer la fibra dietaria soluble, tiene como finalidad producir una hidrólisis con enzimas selectivas en un proceso de separar enlaces β -glucano en la pared celular de vegetales y romper uniones proteicas, aminoácidos y de esa forma mejorar la solubilidad y la viscosidad para llegar a compuestos que sean más fáciles de metabolizar. Por tal razón la selección de enzimas se lo debe hacer de acuerdo al sustrato donde va actuar el pH, tiempo de activación e inactivación.¹²

Se realizó investigaciones, usando enzimas comerciales en los cuales se han obtenido los siguientes resultados; una mezcla de pectinasas (Pectinex ultra SP-L) y celulasas (Sigma 2730) fueron exitosamente aplicadas a la pulpa de banano para la producción de jarabe, en donde estos complejos enzimáticos fueron capaces de romper enlaces de polisacáridos y reducir en gran medida la viscosidad de esta fruta, para de esta forma dar paso a un producto que tenga alta solubilidad y pueda ser aplicado a la industria alimenticia.²⁰

Estas enzimas también se usó en otra investigación para aprovechar la gran cantidad de subproductos que se generan en la industria de jugos cítricos en este caso la cáscara de naranja, el interés de Grohmann *et al.* (1992) fue aplicar enzimas que ataquen la pared celular de esta fruta e hidrolize los polisacáridos que la constituyen y generen azúcares más fáciles a la fermentación, partiendo que se deseaba dar un mejor uso a este subproducto que había sido usado principalmente en la alimentación de ganado.²¹

(20) **Somruedee, T.,** Supawadee C. (2008).Banana (Musa sapientum Linn.) Syrup with high soluble dietary fiber from banana puree as affected by pectinases/cellulases enzymes treatment 35Th Congress on Science and Tecnology of Thailand Thailand, Departament of Food Tecnology, Faculty of Sicence.

(21) **Grohmann,K.,** Saldwin A. (1992)"Hydrolysis of orange peel with oectinase and cellulaseenzymes"Biotechnology Letters" 14:

La mezcla de enzimas (Maxlife 85, Lipopan Extra, Pentopan Mono BG y Celluclast) se aplicó a residuos generados en la elaboración de cerveza (trillados de la cebada), y de esta forma se incrementó de un 2,3% a 11,5% el contenido de fibra dietaria soluble y ser incorporada en la elaboración del pan permitiendo dar un valor agregado a un producto que es consumido mayoritariamente por la población.²²

En el mejoramiento de fibra dietaria soluble en trigo a través de modificación enzimática se realizó análisis preliminares con Pectinex y Pectinex Ultra SP, pero no produjo ningún cambio en el contenido de fibra. Cuando se trabajó con hemicelulasa hubo variabilidad en el contenido de fibra el mismo que fue evidenciado al cuantificarla mediante el método de Prosky.²³

En el pergamino de café, se efectuó tratamientos enzimáticos para modificar el balance de fibra dietaria soluble FDS e insoluble FDI con la aplicación de celulasa, hemicelulasa y un complejo enzimático viscozyme, en donde este último permitió obtener un buen balance de FDI/FDS (2,38:1) con un volumen de 800 μ l.²⁴

Por todo lo mencionado anteriormente, la presente investigación pretende obtener una relación de FDI/FDS (3:1) en la cáscara de cacao modificada enzimáticamente para que este residuo sea considerado como ingrediente en la elaboración de alimentos procesados.¹⁰

(22) Stojceska, V., Ainsworth, P. (2008). "The effect of different enzymes on the quality of high-fibre enriched brewer's spent grain breads." *Food Chemistry***110**: 865-872.

(23) Nam, Y., Grundleger, L. 1990. Improvement in soluble fiber content of wheat fiber through enzymatic modification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 38(4):1142-1145.

(24) Torres, M. P., Vargas, G. (2010). "Modificación enzimática de la fibra dietaria del pergamino de café (Coffe arábica L.)." *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos* **2**: 262-271.

CAPITULO III

4. METODOLOGÍA:

4.1. Materia prima.

El material de estudio fue la cáscara de cacao obtenida del beneficio de las mazorcas (*Teobroma cacao* L.) de la variedad Complejo nacional por trinitario, suministradas por la compañía TRANSMAR provenientes de los sectores Taura y Cone de la provincia del Guayas. A las mazorcas se les realizó el beneficio en el laboratorio de Alimentos (CETTIA).

4.2. Preparación de las muestras.

La cáscara se cortó en cubos de 1cm², y secó a temperatura de 60°C en una estufa Memment durante 72 horas, tiempo establecido en análisis preliminares para alcanzar una humedad inferior de 10% para así evitar los cambios en las propiedades funcionales y en el contenido de polifenoles, taninos, antocianidinas, proteínas y estructura de la fibra dietaria.¹⁰

Luego de alcanzar la humedad deseada la cáscara se molió con el equipo *Cyclone simple mill*, se separó las partículas comprendidas entre (200-600 µm) con un tamiz Endecotts. El residuo deshidratado y molido se almacenó a temperatura ambiente en bolsas plásticas con sello hermético Ziploc.

4.3. Composición proximal de la cáscara de cacao.

Para la composición proximal de la cáscara de cacao se aplicaron los siguientes métodos:

Análisis de grasas: método AOAC 954.02

Análisis de humedad: método AOAC 934.16

Análisis de proteína cruda: método AOAC 920.152

Análisis de cenizas: método AOAC 942.05

Análisis de fibra cruda: método AOAC 978.10

Análisis de extractos libre de nitrógeno: método AOAC 986.25

4.4. Enzimas utilizadas

Se utilizó tres enzimas: celulasa (actividad ≥ 3 U/mg), hemicelulasa (actividad 0,3-3,0 U/mg), derivadas de *Aspergillus niger* y viscozyme® expresada como 100 FBG/g (Fungal Beta Glucanase).¹⁶

4.5. Tratamiento enzimático (ver Anexos).

El método que se usó fue una patente estadounidense (Method for enriching soluble dietary fibre) de Malkki *et al*, (1998) que tiene como objetivo, hidrolizar compuestos de la pared celular de frutas y vegetales, para enriquecer su contenido de fibra dietaria soluble.¹²

Se utilizó reactivos grado alimenticio (USP) y el procedimiento consistió en:

4.5.1. Pesar la muestra (6 gr) de residuo deshidratado.

4.5.2. Colocar en un vaso de 600 ml.

4.5.3. Hidratación de la muestra: se mezcló la muestra con una solución buffer fosfato (0,2M) - citrato (0,1M) a pH en función de la enzima a emplear. En el caso de usar hemicelulasa y viscozyme el pH del buffer fue de 4.5 y pH de 5 con la celulasa.

La relación de muestra – buffer fue de 1:20, 6 gramos de muestra y 120 ml de solución buffer según pruebas preliminares que se realizaron.

4.5.4. Tratamiento enzimático:

Se trabajó con tres enzimas comerciales celulasa, hemicelulasa, y viscozyme y seis volúmenes (200, 400, 600, 800, 1000, 1200 µl) por triplicado.⁴

Se cubrió con una lámina de aluminio el vaso que contenía la muestra.

Se activó las enzimas dependiendo de su ficha técnica: celulasa a pH 5 a 37°C por 2h, hemicelulasa a pH de 4.5 a 40°C por 2h y viscozyme a pH de 4.5 por 4 h.

Se inactivó las enzima a 90°C por 5 minutos.

Se añadió 4 volúmenes de etanol en cada muestra (480 ml) para la precipitación de la fibra.

Se cubrió con láminas largas de papel aluminio y se dejó precipitar por una hora.

Se colocó en tubos de centrifuga.

Se centrifugó a 1000 rmp x 15 min.

Se eliminó el sobrenadante con la ayuda de una micro pipeta.

Se colocó el sedimento en una capsula de porcelana.

Se secó las muestras a 60°C hasta que la humedad sea inferior al 10%.

Se trituroó la muestra con ayuda de un pistilo.

4.6. Cuantificación fibra dietaria total, fibra soluble y fibra insoluble

(ver Anexos).

El análisis fibra dietaria total, fibra soluble y fibra insoluble se basó en el método de Prosky (AOAC 991.43, and AACC 32-07) que tiene como fundamento el empleo de enzimas para la eliminación de azúcares libres, almidón y proteínas para luego cuantificarlo gravimétricamente.²⁵

Se dieron algunos cambios en el procedimiento de Megazyme para analizar fibra dietaria: utilizamos papel filtro sin celite (partículas que evitan acumulación de sólidos.) para filtrar las muestras y el buffer phosphate pH de 6 (0,08 M) por buffer MES-TRIS pH de 8,2 (0,05 M).

4.7. Determinación de la actividad enzimática frente al sustrato Carboximetilcelulosa (CMC) (ver Anexos).

Se estandarizó la actividad enzimática de cada enzima frente al sustrato estándar carboximetilcelulosa (CMC), mediante la estimación de azúcares reductores por el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) del método IUPAC (Ghose,1987). La actividad enzimática se obtuvo en unidades internacionales (UI) por ml de solución.²⁶

4.8. Análisis Estadístico.

Se utilizó un diseño factorial 6x3x2. Como variable respuesta se evaluó el balance FDI/FDS que se obtuvo de cada tratamiento.

Los factores de estudio fueron: tipo de enzima (celulasa, hemicelulasa, viscozyme® L), volumen de enzima (200, 400, 600, 800 1000 y 1200 µl) y dos sectores: Taura, Cone con tres repeticiones cada ensayo. El análisis de resultados se llevó a cabo usando el paquete estadístico Minitab® Statistical Software, versión 14.^{4 11}

(25) Sánchez, B. S. (2005).Caracterización Físicoquímico y Funcional de la Fibra Dietética del Fruto del Níspero (*Eriobotrya japonica*) y de la Cascara de Mango (*Mangifera indica* l). Instituto de Agroindustrias Oaxaca, Universidad Tecnológica de las Mixteca. Ingeniero en alimentos: 76.

(26) Ghose, T., K, (1987). Measurement of Cellulase Activities Applied Chemistry Division Commission on Biotechnology. I. U. o. P.a. A. Chemistry. New Delhi-110016, India Indian Institute of Technology 11.

4.9. Planteamiento de hipótesis.

H0: Las variables como: tipo de enzima, cantidad de enzima, y sitios de procedencia de las muestras no afectan la relación FDI/FDS en la cáscara de cacao.

H1: La interacción de las tres variables (tipo de enzima, cantidad enzima y sitio) si afecta la relación FDI/FDS en la cáscara de cacao.

CAPITULO IV

5. Resultados y Análisis

Tabla 1. Composición proximal (%B.S) de los residuos de cacao.

| RESIDUO | SECTOR | CENIZAS | PROTEINA | GRASA | FIBRA CRUDA | EXTRACTO LIBRE DE NITROGENO |
|---------|--------|---------|----------|-------|-------------|-----------------------------|
| Cáscara | Taura | 10,87 | 8,04 | 2,03 | 36,01 | 43,03 |
| | Cone | 11,22 | 7,99 | 2,74 | 31,05 | 46,01 |

Fuente: El autor

Al observar los resultados (Tabla 1) el sector Taura presentó un 5% más de fibra cruda (FC) que el sector Cone. El contenido de fibra depende de la maduración de las plantas ya que estas sufren cambios fisiológicos como la acumulación de celulosa y otros carbohidratos complejos, estos tejidos llegan a enlazarse a través de un proceso conocido como lignificación. Por consecuencia a mayor edad de la planta su contenido de fibra aumenta.²⁷

El sector Cone tuvo un 3% más de extracto libre de nitrógeno (ELN), dentro de este parámetro se encuentran hidratos de carbono libre de celulosa como: almidones, azúcares reductores, hemicelulosas, gomas, y parte de lignina, todos ellos muy digeribles. Los productos vegetales que contengan mayor extracto libre de nitrógeno contienen poca fibra cruda.²⁸ Al comparar nuestros resultados evidenciamos que efectivamente el sector Cone presentó mayor cantidad de (ELN) y menor cantidad de (FC) respectivamente.

(27) **Hoffman, K.**, Lundberg, L.,Randy, D.,Shaver, F. (2007). "El Efecto de la Madurez en la Digestibilidad del FDN (Fibra Detergente Neutro)." University of Wisconsin-Madison 4 UW-Madison, Department of Agronomy.5: 1-2.

(28) **Cheftel, H.** (1989). "Introducción a la Bioquímica y tecnología de alimentos

Tabla 2. Contenido de fibra dietaria en residuo de cacao.

| RESIDUO | SECTOR | Fibra | Fibra | Fibra | Relación FDI/FDS |
|---------|--------|--------------------------|------------------------------|----------------------------|---------------------|
| | | Dietaria Total FDT | Dietaria Insoluble FDI | Dietaria Soluble FDS | |
| Cáscara | TAURA | 59,90% | 56,82% | 3,08% | 18,44:1 |
| | CONE | 66,57% | 64,06% | 2,35% | 27,2:1 |

Fuente: El autor

El sector Cone presentó un 6,67% de (FDT) y 7,2% de (FDI) más que el sector Taura. La diferencia del contenido de fibra dietaria entre los dos sitios de análisis se debió a varios factores: diferencias en las condiciones de crecimiento de las plantas, edad de los cultivos y factor ambiente, este último afectando significativamente los componentes bioquímicos de la mazorca²⁵. Posiblemente la edad en las plantaciones de Taura y Cone fue la razón para la diferencia de contenido de fibra de estos dos sectores, pues una planta alcanza su máxima producción a los 20 años disminuyendo gradualmente hasta considerarse no rentable a los 60 años; además el porcentaje de celulosa y de lignina aumenta con la maduración.¹³

Al comparar los resultados de la presente investigación con una patente Española sobre la identificación de fibra dietaria en cascarilla de semilla de cacao resultó ser que nuestra cáscara de cacao tiene más contenido de fibra dietaria total, fibra insoluble, y menor contenido de fibra soluble.²⁹

El contenido en fibra dietaria de la cáscara de cacao de la presente investigación también fue superior a alimentos considerados “ricos en fibra” tales como cereales y legumbres (25- 30%).¹⁴

(29) **Casanovas** J.R. (1997) Nuevo producto de fibra de cacao a base de cáscara de cacao tostada, in: S. A. Moner y Llacuna (Ed.), Oficina Española de Patentes y Marcas, España.

El aporte de fibra dietaria de los dos sectores no cumple con la relación de FDI/FDS de excelente (50:50) ni adecuado (70:30) para ser usado como ingrediente en alimentos procesados.¹⁰ La calidad de una fibra depende de la composición equilibrada entre las fracciones soluble e insoluble, cuanto más equilibrada esté más funciones fisiológicas puede aportar en la nutrición, por lo que la cáscara de cacao de los sectores de análisis no está equilibrada en su composición ni en su relación de fibras solubles e insolubles. El residuo de cacao de los sectores Cone y Taura mostró valores similares a los de la cáscara de piña que tiene una relación (FDI/FDS) de 22,63:1 los mismos que no pueden ser empleados en fórmulas alimenticias.³⁰

Tabla 3. Balance de FDI/FDS en residuo de cacao luego de aplicar tratamientos enzimáticos en el sector Cone.

| Enzima | | Celulasa | Hemicelulasa | Viscozyme |
|---------|---------|----------|--------------|-----------|
| Volumen | | | | |
| 200 µl | FDI | 59,60 | 59,63 | 59,39 |
| | FDS | 5,30 | 5,29 | 5,53 |
| | FDI/FDS | 11,26 :1 | 11,27:1 | 10,74:1 |
| 400 µl | FDI | 59,51 | 59,52 | 58,88 |
| | FDS | 5,41 | 5,40 | 6,04 |
| | FDI/FDS | 11,00:1 | 11,01:1 | 9,75:1 |
| 600 µl | FDI | 59,40 | 59,40 | 58,55 |
| | FDS | 5,52 | 5,52 | 6,37 |
| | FDI/FDS | 10,77:1 | 10,84:1 | 9,75:1 |
| 800 µl | FDI | 58,61 | 59,39 | 54,01 |
| | FDS | 6,31 | 5,53 | 10,91 |
| | FDI/FDS | 9,28:1 | 10,74:1 | 5,84:1 |
| 1000 µl | FDI | 58,60 | 59,39 | 54,01 |
| | FDS | 6,32 | 5,53 | 10,91 |
| | FDI/FDS | 8,01:1 | 10,74:1 | 4,95:1 |
| 1200 µl | FDI | 58,53 | 59,46 | 53,98 |
| | FDS | 6,31 | 5,56 | 10,91 |
| | FDI/FDS | 7,95:1 | 10,72:1 | 4,94:1 |

Fuente: El autor.

Variabilidad en la relación de fibra dietaria insoluble / fibra dietaria soluble cuando se aplicó seis volúmenes de enzimas (Tabla 3).

(30) **Baquero, C., Bermúdez, A.** (2006). "Los residuos vegetales en la industria de jugo de maracuyá como fuente de fibra dietaria. " Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia.: 207-214.

Tabla 4. Balance de FDI/FDS en residuo de cacao luego de aplicar tratamientos enzimáticos en el sector Taura.

| Volumen | Enzima | Celulasa | Hemicelulasa | Viscozyme |
|---------|---------|----------|--------------|-----------|
| 200 µl | FDI | 60.67 | 60.88 | 60.44 |
| | FDS | 3.46 | 3.40 | 3.65 |
| | FDI/FDS | 17,73:1 | 17,80:1 | 16,54:1 |
| 400 µl | FDI | 60.01 | 60.45 | 59.86 |
| | FDS | 3.64 | 3.64 | 4.23 |
| | FDI/FDS | 11,00:1 | 16,61:1 | 14,17:1 |
| 600 µl | FDI | 59.99 | 60.33 | 58.45 |
| | FDS | 4.10 | 3.73 | 5.63 |
| | FDI/FDS | 8,29:1 | 16,12:1 | 10,38:1 |
| 800 µl | FDI | 57.19 | 60.36 | 54.88 |
| | FDS | 6.89 | 3.72 | 9.2 |
| | FDI/FDS | 9,28:1 | 16,21:1 | 5,96:1 |
| 1000 µl | FDI | 57.19 | 60.36 | 54.8 |
| | FDS | 6.89 | 3.72 | 9.26 |
| | FDI/FDS | 8,29:1 | 16,21:1 | 5,91:1 |
| 1200 µl | FDI | 57.2 | 60.36 | 54.8 |
| | FDS | 6.88 | 3.73 | 9.26 |
| | FDI/FDS | 8,25:1 | 16,21:1 | 5,91:1 |

Fuente: El autor.

Variabilidad en la relación de fibra dietaria insoluble / fibra dietaria soluble cuando se aplicó seis volúmenes de enzimas (Tabla 4).

La aplicación de las tres enzimas: celulasa, hemicelulasa y el complejo enzimático viscozyme modificó el balance de FDI/FDS (Tabla 3 y 4). En los sectores Cone y Taura la máxima disminución de fibra dietaria insoluble (FDI) y el mayor incremento de fibra dietaria soluble (FDS) fue con viscozyme a 1200 µl. La poca eficiencia de la celulasa y hemicelulasa sobre la cáscara de cacao se debió, a que estas son muy específicas al sustrato donde actúa, ya que solo hidrolizaron celulosa y hemicelulosa quedando atrapados compuestos que forman parte de la fibra soluble, y por lo tanto no hubo cambio entre las fracciones solubles e insolubles.^{17 30}

El balance de FDI/FDS más bajo se obtuvo con el complejo enzimático viscozyme en el sector Cone (4,95:1). Al comparar este resultado con salvado de trigo que es una de las mayores fuentes de fibra usadas en la industria alimentaria con una relación FDI/FDS de 24:1 resultó ser que la cáscara de cacao modificada enzimáticamente tiene un mejor balance que la del salvado de trigo, y puede ser considerada como buena fuente de fibra dietaria insoluble y soluble y ser usada como ingrediente en la formulación de alimentos.^{10 25}

En la presente investigación el contenido de fibra dietaria soluble inicial aumentó 8,56% en el sector Cone y 6,18% en el sector Taura usando la enzima viscozyme, resultados satisfactorios si comparamos con la modificación enzimática en trigo realizada por Nam, (1990) cuyo contenido de FDS inicial incrementó 4% usando hemicelulasa.²³

Napolitano *et al*, (2006) probaron y validaron un tratamiento enzimático con enzimas proveniente de *Trichoderma* que fue aplicado a cereales, en donde se incrementó la cantidad de fibra dietaria soluble tres veces de su estado original sin disminución marcada de la fibra dietaria total, resultados similares hemos obtenido con la modificación enzimática en la cáscara de cacao.³¹

La eficiencia del complejo enzimático viscozyme sobre la cáscara de cacao que mejoró el balance de FDI/FDS se debió a que ésta es una mezcla de arabinasa, celulosa, B-glucanasa, hemicelulosa, xilanasas, pectinasas y pentosanasa, especialmente eficientes en la rotura de paredes celulares, en un proceso de hidrólisis liberando compuestos que forman parte de la fibra soluble (glucosa, arabinosa, xilosa, galactosa) que son más fáciles de metabolizar.¹⁹

(31) **Napolitano** A, Lanzuise S, Ruocco M, Arlotti G, Ranieri R, Knutsen SH, Lorito M, Foglian V. 2006. Treatment of cereal products with a tailored preparation of *Trichoderma* enzyme increases the amount of soluble dietary fiber. *Food Chemistry* 54:7863–9.

La enzima viscozyme fue empleada en otras investigaciones en donde se han obtenido excelentes resultados como la aplicación en semillas de zaragotana para modificar su estructura e incrementar su poder de absorción y formación de geles, y ser usada en la elaboración de productos con efectos laxantes.³² Viscozyme también se usó en la elaboración de etanol a partir de la hidrólisis de la harina de trigo para la obtención de azúcares que sean fáciles a la fermentación.³³

El objetivo final de este trabajo fue mejorar la relación de fibra dietaria insoluble / fibra dietaria soluble mediante tratamiento enzimático, y obtener resultados similares a los obtenidos a la modificación enzimática con viscozyme realizada al pergamino de café (2,39:1), los resultados obtenidos en la cáscara de cacao fueron de 4,94:1 y 5,91:1 en las muestras de los sectores Cone y Taura respectivamente no logrando obtener la relación esperada de 3:1 que es considerada ideal para ser usada como ingrediente de alimentos^{11 24 25}.

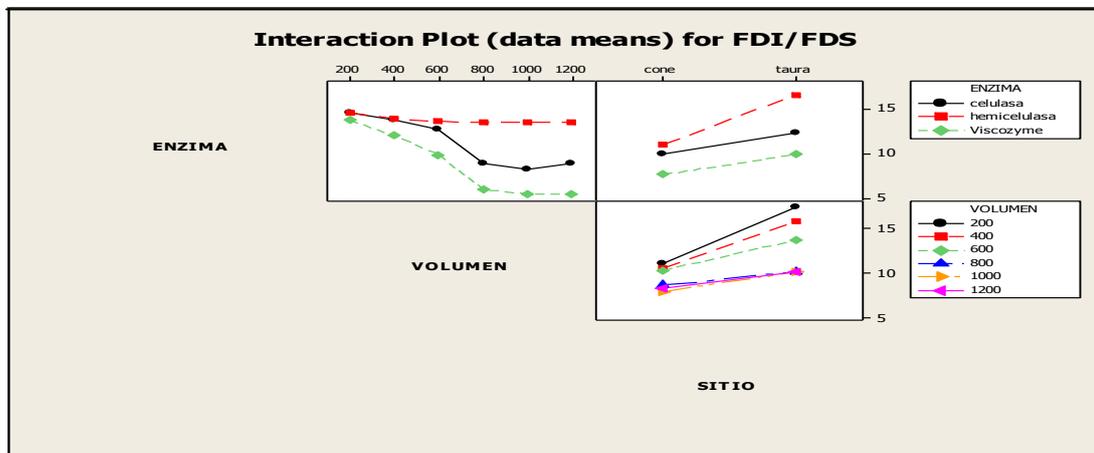
Tabla 5. Análisis de varianza para FDI/FD

| | DF | Seq SS | Adj SS | Adj Ms | F | P |
|----------------------|-----|---------|---------|--------|--------|-------|
| Enzima | 2 | 166,502 | 166,502 | 83,251 | 360,40 | 0,000 |
| Volumen | 5 | 153,845 | 153,845 | 30,769 | 133,20 | 0,000 |
| Sitio | 1 | 46,099 | 46,099 | 46,099 | 199,57 | 0,000 |
| Enzima * Volumen | 10 | 95,821 | 95,821 | 9,582 | 41,48 | 0,000 |
| Enzima *Sitio | 2 | 5,216 | 5,216 | 2,608 | 11,29 | 0,000 |
| Volumen *sitio | 5 | 5,430 | 5,430 | 1,086 | 4,70 | 0,001 |
| Enzima*Volumen*Sitio | 10 | 6,975 | 0,697 | 3,02 | 0,003 | |
| Error | 72 | 16,632 | 16,632 | 0,231 | | |
| Total | 107 | 496,519 | | | | |

S = 0,480621 R-Sq = 96,65% R-Sq (adj) = 95,02%

Al analizar los datos obtenidos experimentalmente (tabla 3 y 4) mediante un análisis estadístico factorial para la variable respuesta FDI/FDS en los sectores Cone y Taura podemos observar (tabla 5) que existe significancia entre los factores principales, entre las interacciones dobles y triples.³⁴

Figura 1. Interacciones dobles para la variable respuesta FDI/FDS en el sector Cone y Taura.



Al comparar enzima y volumen (figura 1), la hemicelulasa a diferentes concentraciones no muestra significancia alguna a diferencia de celulasa y viscozyme que si son significativas ³⁴. El motivo de estas diferencias radica que la enzima hemicelulasa solo es selectiva para ciertos componentes minoritarios de la pared celular de las plantas.²⁹

La celulasa a distintos volúmenes a diferencia de la hemicelulasa si tuvo diferencia significativa, esto se debe a que esta enzima fue capaz de hidrolizar celulosa compuesto que se encuentra en mayor cantidad en la cáscara.³⁰

(32) Liangli Yu*, Jonathan Perret, Tina Parker, Kenneth G.D. Allen (2003) Enzymatic modification to improve the water-absorbing and gelling properties of psyllium. Food Chemistry 82:243-24

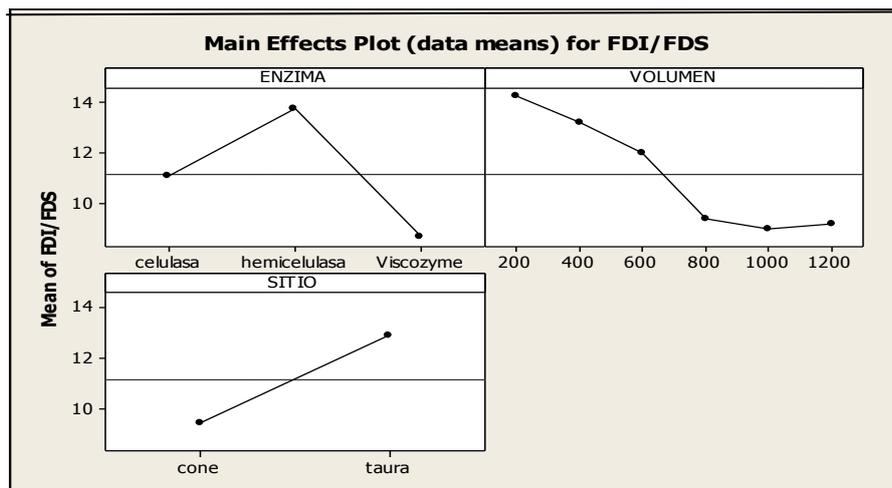
(33) **Novozyme** (2005) "Con Viscozyme® Wheat el macerado fluye en Pound-Maker" 1-2

(34) **Montgomery**, D., G, Runger. (1996). "Probabilidad y estadística aplicadas a la ingeniería. McGraw Hill."

En cuanto a los volúmenes de enzimas usados puede decirse que la hemicelulasa (200 a 1200) μl no mostró cambio alguno en el balance de FDI/FDS. Para celulasa y viscozyme el volumen de 800 μl sería el más adecuado de emplear ya que al compararla con 1000 y 1200 μl existe una mínima diferencia significativa.³⁴

En la interacción de enzima-sitio si presentó significancia entre los dos sectores Cone y Taura esto por la edad de las plantas y tiempo en la maduración que hizo que las enzimas se comportaran de manera diferente. También se puede observar que entre los volúmenes de 800, 1000 y 1200 μl no existió diferencia significativa para los dos sectores de análisis.¹³

Figura 2. Interacciones de los efectos principales para la variable respuesta FDI/FDS



El tipo de enzima, volumen y sitio de las muestras son factores que afectan significativamente al mejoramiento enzimático (figura 2). Al comparar los tres tipos de enzima celulasa, hemicelulasa y viscozyme efectivamente esta última es más eficiente al momento de actuar sobre el sustrato cáscara de cacao resultados que se evidencia en la tabla (3 y 4).¹⁹

El volumen más adecuado para modificar la relación FDI/FDS fue con la enzima viscozyme con volúmenes de 800, 1000,1200 μ l que se observa en los resultados de la (tabla 3) en donde 1200 μ l fue el mejor tratamiento para el sector Cone.¹⁰

Industrialmente se podría usar 800 μ l por cada 6gr de muestra, ya que no existe diferencia significativa con los volúmenes de 1000 y 1200 μ l (figura 1) en la relación FDI/FDS.

CAPITULO V

6. Conclusiones

- Se acepta la hipótesis alternativa H1 : el tipo de enzima, volumen y sitio si afectan afecta el balance de FDI/FDS.
- El complejo enzimático viscozyme modificó el balance de FDI/FDS en el sector Cone de 27,2:1 a 4,94:1 y en sector Taura de 18.,44:1 a 5,91:1 no consiguiéndose llegar a un buen balance entre las fracciones solubles e insolubles de 3:1.
- El mejor tratamiento fue en el sector Cone con viscozyme 1200 μ l ~10ppm y 800 μ l ~ 6,7 ppm para el sector Taura.
- El sitio de procedencia de las muestras también influyó en el contenido de la relación de FDI/FDS, el sector Cone tratado enzimáticamente presentó mejor relación de la fibra soluble e insoluble que el sector Taura .

CAPITULO VI

7. Recomendaciones

- ✓ Determinar si los compuestos fenólicos que están asociados a la capacidad antioxidante que tiene el residuo de cacao se ven afectados luego de aplicar tratamientos enzimáticos.

- ✓ Realizar un fraccionamiento de la fibra dietaria soluble e insoluble y verificar, que compuestos se encuentran en mayor cantidad luego de aplicar tratamientos enzimáticos.

- ✓ Industrialmente se podría usar la enzima viscozyme 800 µl en los sectores Cone y Taura.

ANEXOS

Anexo 1. Diagramas

Diagrama 1. Actividad Enzimática

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Preparación del buffer sodio citrato

(1M; pH 4.5)

Colocar 192.12g de ácido cítrico anhidro ($C_6H_8O_7$) en un vaso de precipitación de 1000 mL



Agregar 750 mL de agua destilada



Agregar NaOH (de 50 a 60g) hasta un pH de 4.3



Trasfiera a un balón de aforo de 1000mL y diluya con agua destilada



Chequee el pH y de ser necesario añada NaOH hasta un pH de 4.5

Preparación del buffer sodio citrato

(0.05M; pH 4.8)

Tomar 500mL de buffer sodio citrato 1M, pH 4.5



Colocar el un balón de aforo de 1000mL



Diluir con agua destilada



Verifique el pH que debe ser igual a 4.8

Preparación de Phenol

(0.1 N)

Tomar 10mL de FolinCiocalteau (2 N)



Colocar en un balón de aforo de 25 mL cubierto con papel aluminio



Agregar 10mL de agua destilada a 50°C



Mezclar y guardar en refrigeración

Preparación de reactivo DNS (60ml)

En un recipiente colocar 57mL de agua destilada



Agregar 0.7 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico



Añadir 0.83 g de NaOH



Disuelva bien



Añada 12.89g de Tartarato de Sodio-Potasio



Agregue 0.32 mL de Phenol 0.1 N



Agregue 0.35g de metabisulfito de sodio

Verificación de Reactivo DNS

Tomar 3mL del reactivo DNS anteriormente preparado



Agregue 2 gotas de fenolftaleína



Titule con HCl 0.1 N



Debería tomar de 5 – 6 HCl

Nota.- Agregue NaOH si requiere (2 g = 1mL 0.1 N HCl)

Preparación del sustrato (CMC al 2%)

Pesar 2 g de Sustrato CMC



Añadir Buffer sodio citrato (pH 4.8) hasta un volumen de 100mL



Homogenizar

Preparación de la dilución de enzima

Preparar 2 diluciones (1:1,5 y 1:10), buffer citrato: enzima



0.5mL de enzima + 1mL de buffer (1:1,5)

5mL de enzima + 5mL de buffer (1:10)



Mezcle bien

Método de ensayo

En un tubo de ensayo de 25mL coloque 0.5mL de cada dilución de enzima



Agregue 0.5mL de la solución de sustrato



Mezcle e incube a 50°C/30 min



Agregue 3.0mL de DNS y mezcle



Coloque en una gradilla



Someta a un baño de agua hirviendo por 5 min.



Inmediatamente sumerja en un baño de agua fría



Mezcle bien invirtiendo totalmente el tubo (importante)



Mida el color formado en el espectrofotómetro a 540 nm



Transforme la absorbencia de la muestra del tubo

Usando una curva de estándares de glucosa

➤ **PREPARACIÓN DE DILUCIONES DE GLUCOSA CON
CONCENTRACIÓN DE 20mg/ml**

% riqueza de glucosa: 99,5

$$C = \frac{m * \%riqueza * V1}{V2}$$

$$\frac{20\text{mg}}{\text{ml}} = \frac{m * 99,5/100 * 10\text{ml}}{10\text{ml}}$$

$$m = \frac{20}{99,5/100}$$

$$m = 20,1 \text{ mg}$$

Pesar 20 mg de glucosa y diluir en 10ml.

Para preparar estándares de glucosa a concentraciones de 0.5; 1; 5; 9. se toma volúmenes de 0,125ml, 0,25ml, 1,75ml, 2,25ml, respectivamente.

$$C1V1 = C2V2$$

$$C1V1 = C2V2$$

$$C1V1 = C2V2$$

$$C1V1 = C2V2$$

$$20V1 = 0,5(5)$$

$$20V1 = 1(5)$$

$$20V1 = 5(5)$$

$$20V1 = 9(5)$$

$$V1 = 0,125\text{ml}$$

$$V1 = 0,25\text{ml}$$

$$V1 = 1,25\text{ml}$$

$$V1 = 2,25\text{ml}$$

Los volúmenes se deben tomar de la solución de glucosa anhidra (20mg/10ml), y aforar a 5ml.

➤ PREPARACIÓN DE ESTÁNDARES

- **Espectro Zero**

1. 0.5 mL de solución del sustrato (CMC)
2. Calentar a 50°C/30min (baño maría)
3. Agregar 3 mL de DNS
4. Agregue 0.5 mL de buffer citrato
5. Mezcle
6. Hierva por 5 min y agregue 20 mL de agua
7. Lea a 540 nm

- **Blanco de enzima**

1. 0.5 mL de solución del sustrato (CMC)
2. Calentar a 50°C/30min (baño maría)
3. Agregar 3 mL de DNS
4. Agregue 0.5 mL de dilución de enzima
5. Mezcle
6. Hierva por 5 min y agregue 20 mL de agua
7. Lea a 540 nm

- **Estándares**

1. 0.5 mL de solución del sustrato (CMC)
2. Calentar a 50°C/30min (baño maría)
3. Agregar 3 mL de DNS
4. Agregue 0.5 mL de estándar de glucosa
5. Mezcle
6. Hierva por 5 min y agregue 20 mL de agua
7. Lea a 540 nm

Cálculos de unidades

1. Construya un estándar lineal de glucosa, usando cantidades absolutas de glucosa (mg/0.5mL) lea a A_{540} .
2. Usando este estándar , transforme los valores de absorbancia de las muestras de los tubos (restándoles el blanco de la enzima) a glucosa (= mg de glucosa producidas durante la reacción)
3. Transforme las diluciones usadas a concentración de enzima

$$\text{Concentración} = \frac{1 \text{ (= volumen de enzima en dilución)}}{\text{Dilución} \quad \text{total volumen de dilución}}$$

4. Estime la concentración de enzima que debió haber liberado exactamente 0.5 mg de glucosa mediante la lectura de glucosa liberada (Y) versus la concentración de enzima(X) en una grafica semilogaritmica. Para este paso se debe utilizar hojas logarítmicas.
5. Cálculo de CMC

$$\text{CMC} = \underline{0,185} \text{ units mL}^{-1}$$

Concentración de enzima para liberar 0.5 mg de glucosa

6. Analogía CMC = IU

$$1 \text{ IU } (\mu\text{mol min}^{-1}) = 1 \text{ CMC (units mL}^{-1}\text{)}$$

DATOS Y RESULTADOS

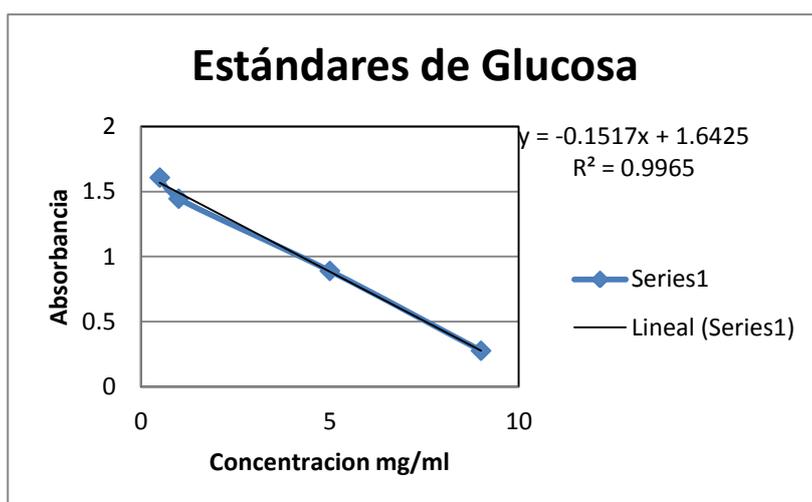
Luego de haber realizado la experimentación, y analizado las muestras de enzimas, podemos decir que:

La curva obtenida es inversamente proporcional, y con los datos obtenidos de la curva de calibración se obtuvo un coeficiente de correlación (r^2) de **0,9965**.

Los valores de absorbancia de las enzimas de concentración 1:1,5 y 1:10 se encuentran dentro de los valores obtenidos de los estándares de glucosa.

| Concentración 1: 1,5 | | Concentración 1: 10 | |
|----------------------|-------------|---------------------|-------------|
| Enzimas | Absorbancia | Enzimas | Absorbancia |
| Celulasa | 0.919 | Celulasa | 1.236 |
| Hemicelulasa | 0.199 | Hemicelulasa | 1.177 |
| Viscozyme | 1.269 | Viscozyme | 0.883 |

| ESTÁNDARES DE GLUCOSA | |
|-----------------------|-------------|
| Concentración mg/ml | Absorbancia |
| 0,5 | 1,607 |
| 1 | 1,445 |
| 5 | 0,89 |
| 9 | 0,277 |



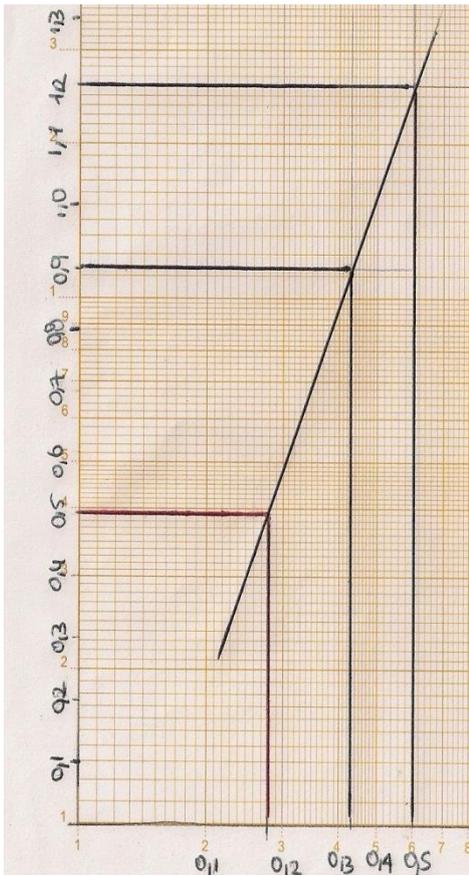
Transformar las diluciones usadas a concentración de enzima

$$\begin{aligned}\text{Concentración 1: 1.5} &= \frac{1(=\text{volumen de enzima en dilución})}{\text{Dilución} \quad \text{total volumen de dilución}} \\ &= \frac{0,5\text{ml}}{1,5\text{ml}} = 0.33\end{aligned}$$

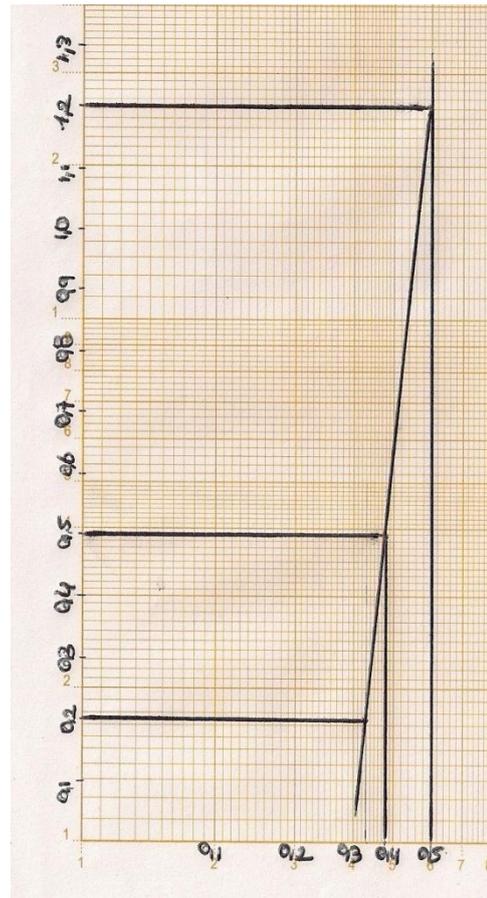
$$\begin{aligned}\text{Concentración 1: 10} &= \frac{1(=\text{volumen de enzima en dilución})}{\text{Dilución} \quad \text{total volumen de dilución}} \\ &= \frac{5\text{ml}}{10\text{ml}} = 0.5\end{aligned}$$

Estime la concentración de enzima que debió haber liberado exactamente 0.5 mg de glucosa mediante la lectura de glucosa liberada (Y) versus la concentración de enzima(X) en una grafica semilogaritmica.

➤ **CELULASA**



HEMICELULASA



CALCULO DE CMC

Calculo CMC = $\frac{0.185}{\text{Concentración de enzima para liberar 0,5 mg de glucosa}}$ units mL⁻¹

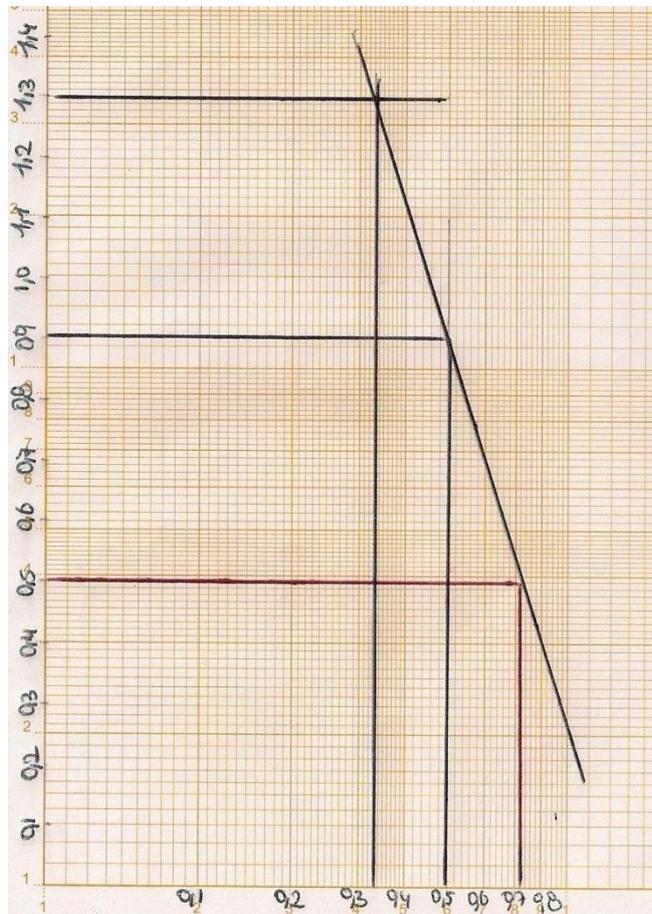
CELULASA: 0,5 mg de glucosa libera con 0,18 de concentración.

$$\frac{0.185}{0,18} = 1,027 \text{ UCMC mg}$$

HEMICELULASA: 0,5 mg de glucosa libera con 0,38 de concentración.

$$\frac{0.185}{0,38} = 0,4868 \text{ UCMC ml}$$

➤ **VISCOZYME**



VISCOZYME: 0,5 mg de glucosa libera con 0,71 de concentración.

$$\frac{0.185}{0.71} = 0.26 \text{ UCMC/ml}$$

RESULTADOS

| ENZIMA | CONCENTRACION |
|--------------|----------------|
| CELULASA | 1,027 UCMC/mg |
| HEMICELULASA | 0,4868 UCMC/ml |
| VISCOZYME | 0,26 UCMC/ml |

Diagrama 2. Tratamiento Enzimático

PROTOCOLO

(Malkki and Myliymaki 1998)

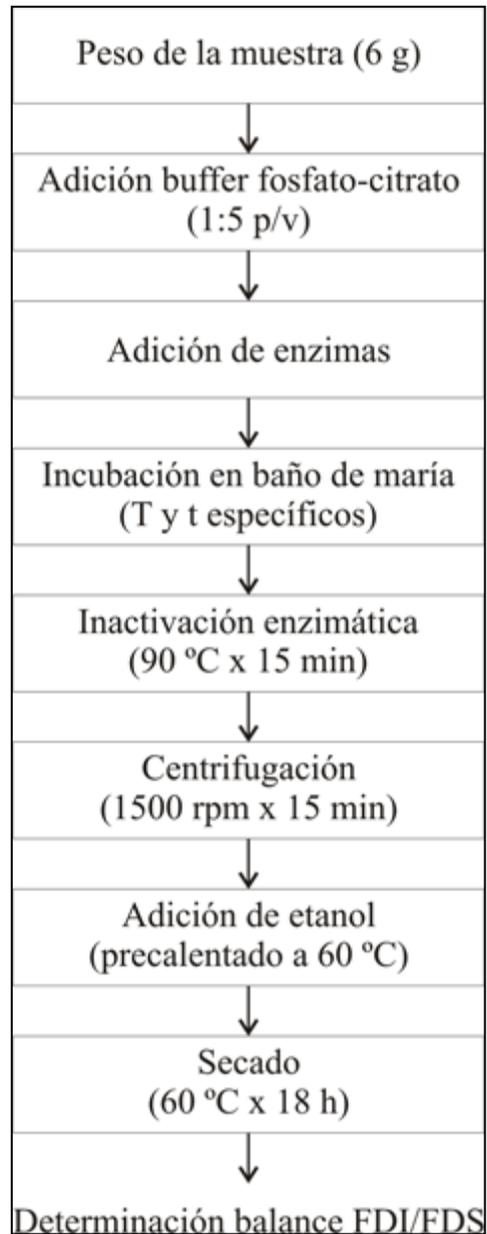
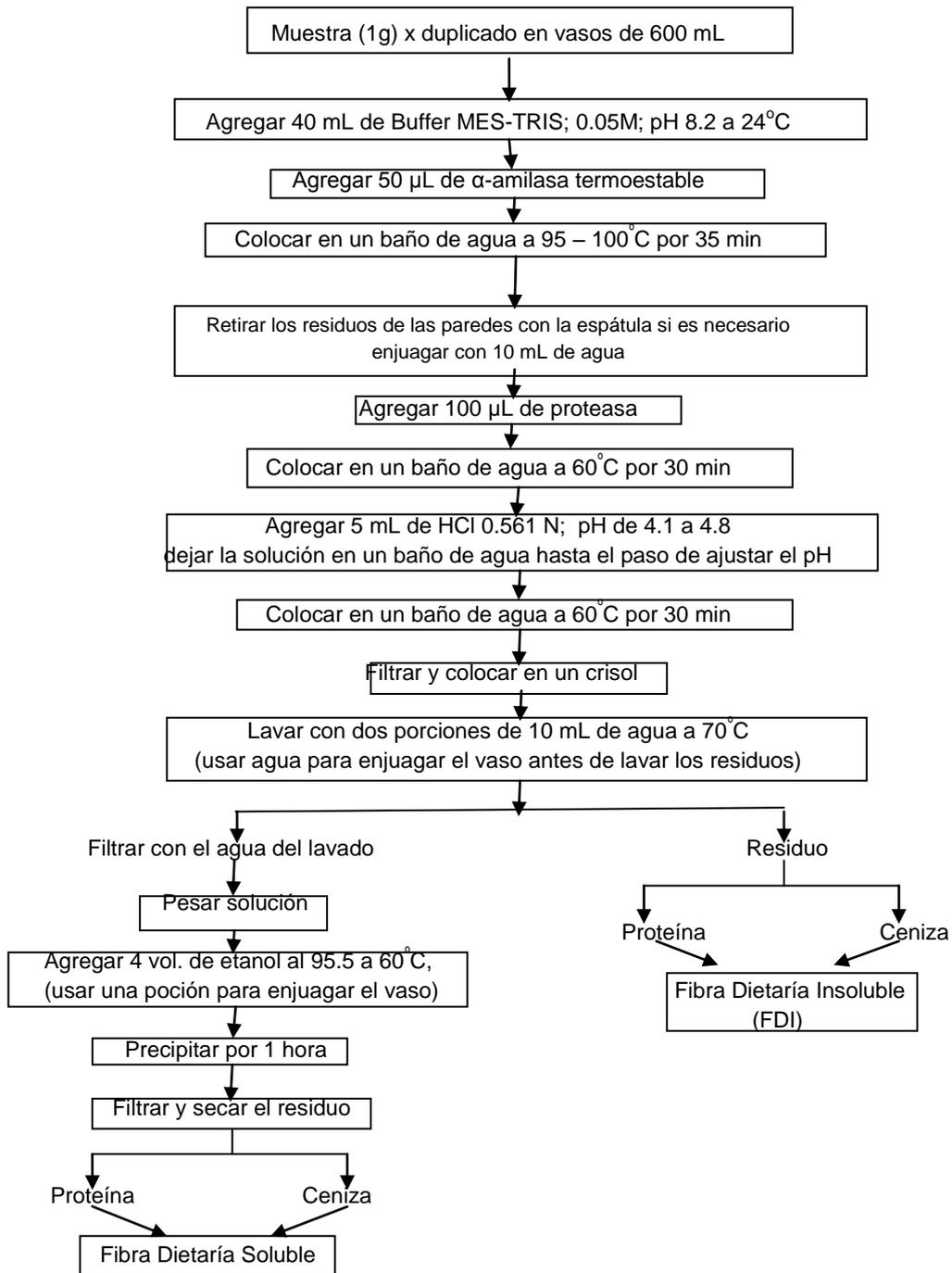


Diagrama 3. Determinación de fibra dietaria soluble e insoluble según el METODO AOAC 991.43

Procedimiento analítico para determinar fibra dietaría soluble e insoluble



Anexo 2. Fichas técnicas de enzimas

Cellulase

Cellulase preparations are typically mixtures of enzymes containing high cellulase activity with some hemicellulase activity. These enzyme mixtures are capable of degrading cellulose, mannans, xylans, galactomannans, pectins, and other polysaccharides.

Cellulase from *Aspergillus* sp.

[9012-54-8] E.C. 3.2.1.4

Activity: 1000 U/g

produced by submerged fermentation of a genetically modified *Aspergillus* microorganism

A product of Novozyme Corp L.

R: 42 S: 23-24-36/37 EC No. 232-734-4 E

C2605-50ML 50 mL

C2605-250ML 250 mL

Hemicellulase from *Aspergillus niger*

Powder, 0.3-3.0 unit/mg solid (using a β -galactose dehydrogenase system and locust bean gum as substrate).

Description

| | |
|-----------------|--|
| Other Notes | View more information on enzymes for complex carbohydrate analysis at www.sigma-aldrich.com/enzymeexplorer |
| Quality | An undefined mixture of glycolytic enzymes usually containing xylanase, mananase and other activities. |
| Unit Definition | One unit will produce a relative fluidity change of 1 per 5 minutes using locust bean gum as substrate at pH 4.5 at 40 °C |

Viscozyme®

**Cell Wall Degrading Enzyme Complex from
Aspergillus sp.**

Lysing Enzyme from *Aspergillus* sp.

Multi-enzyme complex containing a wide range of carbohydrases, including arabanase, cellulase, b-glucanase, hemicellulase, and xylanase

density ~1.2 g/mL, 25 °C

A product of Novozyme Corp. E

V2010-50ML 50 mL

V2010-250ML 250 mL