

Extracción enzimática de esteviolglucósidos en jugo de mora (*Rubus adenotrichus*)

Enzymatic extraction of steviolglycosides in blackberry juice (*Rubus adenotrichus*)

César Castor González Torrivilla¹, Elevina Pérez Sira²

Recibo: 26.04.2017 Aceptado: 17.08.2017

González, C. y Pérez, E. (2017). Extracción enzimática de esteviolglucósidos en jugo de mora (*Rubus Adenotrichus*). *Rev. Colomb. Investig. Agroindustriales*, 4(1), 24-38. doi:<http://dx.doi.org/10.23850/24220582.663>

Resumen

Como estrategia para alcanzar un mayor rendimiento en el procesamiento de pulpa de mora y al mismo tiempo extraer los esteviolglucósidos presentes en hojas deshidratadas de estevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni), fueron evaluados 5 preparados enzimáticos durante la elaboración de un jugo de mora. Se evaluaron dos niveles de las variables consideradas: concentración de enzima (100 y 200ppm) y tiempo de incubación (15 y 30min) en dos medios de extracción: agua y pulpa de mora (a 50 y 35°C, respectivamente). La eficiencia del tratamiento fue analizada a través de la determinación de sólidos insolubles en suspensión, sólidos solubles y cuantificación por cromatografía líquida de alta eficacia o High Performance Liquid Chromatography (HPLC) de estevióside y rebaudiósido A. Con base en el análisis estadístico aplicado se pudo afirmar que no existe ningún efecto, ni en el tiempo de incubación, ni en la concentración del complejo enzimático, sobre los valores resultantes de sólidos solubles totales, pero sí en los SIS, del preparado comercial ®Pectinex Ultra AFPL. En relación con la extracción de esteviolglucósidos, tanto en los ensayos de extracción en jugo de mora como en agua, hay diferencias estadísticamente significativas al valorar el binomio enzima*tiempo. Las concentraciones más altas de esteviolglucósidos fueron alcanzadas empleando 200ppm de ®Pectinex Clear durante 30 segundos. A pesar de ello, los valores obtenidos son similares a las concentraciones cuantificadas en la muestra testigo, lo que corrobora que la difusión de estos compuestos de las hojas al medio, ocurre principalmente por la solubilidad de los mismos, más que por la hidrólisis originada por las enzimas específicas empleadas en el estudio.

Palabras clave: Pectinasa; hemicelulasa; celulasa; poligalacturonasa; estevia.

1 Docente adscrito al Departamento de Procesos Agroindustriales del Programa Ingeniería Agroindustrial, UCLA, Venezuela cesargonzalez@ucla.edu.ve

2 Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela perezee@hotmail.com

Abstract

The goals of the study were to evaluate yield of the blackberry juice preparation, and at same time of the extraction of sweetener glycosides from dehydrated stevia leaves (*Stevia rebaudiana* Bertoni), by using enzymatic preparations. Five enzyme preparations were evaluated during the preparation of the sweetener with these glycosides. Two levels of the variables studied were evaluated: enzyme concentration (100 and 200ppm), and incubation period (15 30min), and using two extraction solvents at two temperatures: water and blackberry juice (at 50 and 35 °C, respectively). Efficiency and yield was analyzed by determining suspended insoluble solids (SIS), soluble solids (SS), and quantitation by cromatografía líquida de alta eficacia o High Performance Liquid Chromatography (HPLC) of the main esteviolglucósidos (stevioside and rebaudioside A). Statistical analysis data shown that the incubation time and the enzyme concentration in the enzyme complex did not affect total soluble solids values, but it does in the concentration of SIS, when using the commercial preparation Pectinex Ultra AFPL, as compared with the rest of the tested samples. Similarly, it is shown statistically significant differences in assessing the enzyme-time binomial, in the steviolglycosides extraction in water and blackberry juice. A high concentration of stevioside and rebaudioside A were achieved when using Pectinex Clear, at a concentration of 200 ppm during 30 seconds. However, the obtained values are similar to concentrations quantified in the control sample showing a slight influence of enzymes in the extraction of both steviolglycosides. This result corroborates that the diffusion of these compounds from the leaves to the medium, occurs primarily by the solubility thereof, rather than by hydrolysis caused by specific enzymes used in the study.

Keywords: Pectinase; hemicellulase; cellulase; polygalacturonase; stevia.

Introducción

Los edulcorantes no nutritivos son aditivos alimentarios usados como acentuadores de sabor para proporcionar sabor dulce a bebidas y alimentos. Se caracterizan por no aportar energía o por proporcionar cantidades poco significativas, resultando un producto con menor aporte calórico (Hamilton, Guzmán, Golusda, Lera, Cornejo, 2013).

En el mundo, al hablar del consumo de edulcorantes naturales, la estevia está ganando espacio en el mercado de endulzantes por las propiedades dulcificantes de sus hojas, pero existe poco cultivo de la misma debido a la falta de incentivos eficaces para su producción, conocimiento de su valor nutricional y de las

propiedades medicinales que posee, aunque ya se observa en los supermercados y tiendas naturistas a nivel mundial, la presencia y el consumo creciente de estevia en distintas formas. (González, Tapia, Pérez, Dornier y Morel, 2014b).

Los glucósidos que en mayor proporción se encuentran en las hojas de estevia, y por tanto son los principales responsables de esta cualidad, son el esteviósido y el rebaudiósido A. Además de tener la capacidad de endulzar de 250 a 300 veces más que el azúcar común (Durán, Rodríguez, Cordón, Record y Jiniva, 2012), no afectan la concentración de glucosa en sangre, por lo que resultan totalmente inoocuos para los diabéticos, y especialmente útiles en dietas hipocalóricas. Adicionalmente

se les atribuyen otras propiedades benéficas, por su acción antiácida, antibacteriana, antidiabética, cardiotónica, digestiva, diurética, hipoglucemiante, hipotensora, mejoradora del metabolismo y vasodilatadora, soportadas por estudios con carácter científico desde 1970 (González y Moralejo, 2011).

Por otro lado, el uso de las preparaciones enzimáticas comerciales, como tratamiento previo a las materias primas, es de vital importancia en la elaboración industrial de jugos pulposos de fruta debido a que su clarificación es muy tediosa, producto de la alta concentración de sólidos en suspensión. El efecto de la hidrólisis enzimática es convertir las macromoléculas en moléculas más pequeñas y mejorar los flujos del jugo refinado y por lo tanto disminuir el efecto de colmataje (Vaillant *et al.*, 1999).

La selección de la preparación enzimática apropiada, que trabaje de forma sinérgica con los procesos mecánicos (pulverización, prensado, filtración etc.), ayuda a obtener extractos de calidad, estables, completamente naturales y a maximizar la eficacia del equipo utilizado en los tratamientos (Madrid, 2001). La influencia de las enzimas en el flujo es explicada por Laverde (2010), de la siguiente forma: Inicialmente se observa una disminución del flujo del permeado, debido a que las partículas se acumulan en la pared de la membrana y forman la capa de colmataje. La velocidad de formación de esta capa es superior a la velocidad de acción de las enzimas. Luego, se observa un aumento de flujo en el permeado debido a que en los alrededores de la membrana, donde se forma la capa de colmataje, aumenta la concentración de macromoléculas, que son los sustratos de las enzimas (Hart & Huxsoll, 1989). Se produce entonces un aumento de flujo debido a que la velocidad de acción de las enzimas es superior a la velocidad de formación de la capa de colmataje.

Con base en los argumentos señalados, fueron evaluados diversos preparados enzimáticos comerciales, empleados regularmente en la

maceración de pulpas de frutas, para la extracción de los principales esteviolglucósidos en zumo de mora. La investigación incluyó la evaluación del medio de extracción (agua y zumo de mora) para extraer por lixiviación de hojas deshidratadas de estevia los principales esteviolglucósidos, con el propósito de evidenciar las condiciones en las cuales se garantizan la mayor extracción de esteviolglucósidos, concretamente: esteviósido y rebaudiósido A.

Materiales y métodos

Se utilizaron moras (*Rubus adenotrichous*) de la variedad localmente conocida como “vino con espinas”. Éstas fueron adquiridas de la Asociación de Productores y Exportadores de Mora y Frutales de Altura (APROCAM, San José, Costa Rica), en estado de madurez fisiológica y congeladas a -20°C . Una vez recibidas, se distribuyeron homogéneamente en contenedores plásticos, los cuales fueron almacenados en condiciones de congelación (-20°C) hasta su uso. 24 horas antes del día previsto para su procesamiento, fueron trasladados a una cámara de refrigeración para su descongelación. El proceso tecnológico aplicado a los frutos enteros para obtener la pulpa, se esquematiza en la Figura 1.

Para la obtención de la pulpa refinada se sometió la totalidad del lote de moras a una etapa de prensado. Para ello, las moras fueron introducidas en mantas de tela en el interior del cilindro perforado de la prensa (Marca CRC con una capacidad de 25 toneladas). La presión y el tiempo (2,5bar/5min) de la operación fueron constantes, ya que el equipo opera según el caudal suministrado por la red de agua de la planta piloto. La pulpa obtenida fue distribuida homogéneamente en tambores plásticos previamente desinfectados, y al igual que en los frutos enteros se contempló la adición de 10 kg de pulpa por tambor. Inmediatamente después del envasado, los tambores fueron trasladados a una cámara de congelación, en donde fueron almacenados a -20°C hasta su uso.

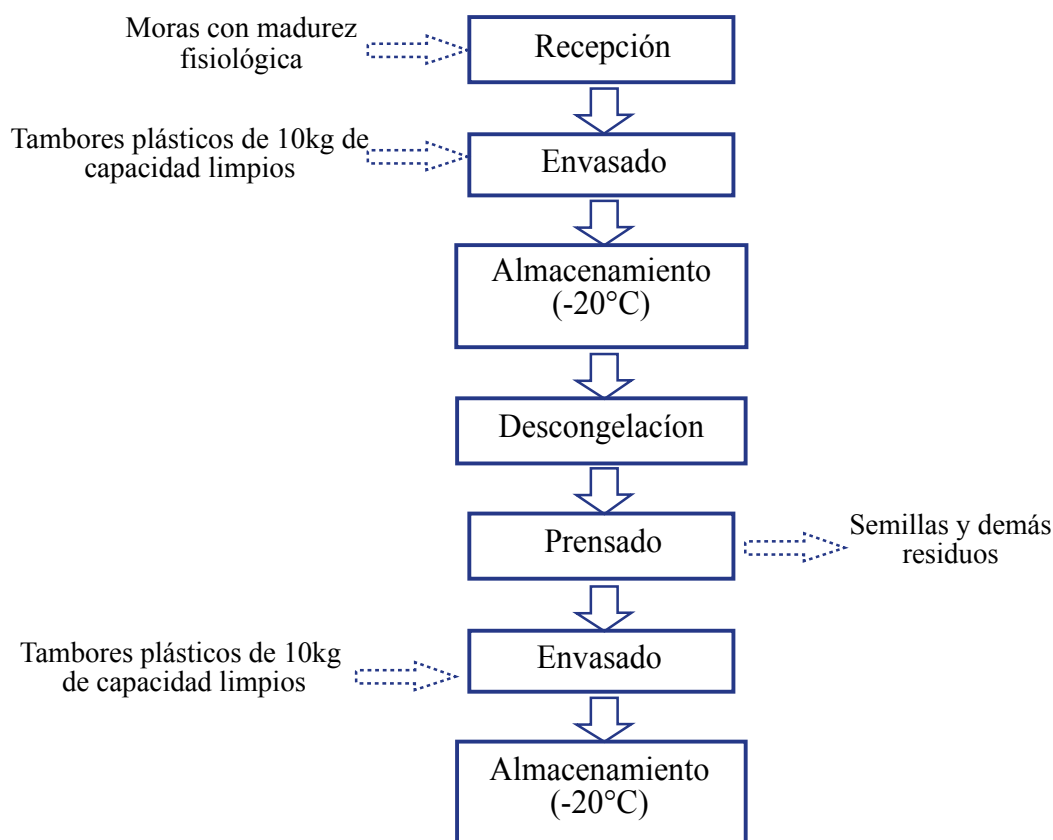


Figura 1. Esquema tecnológico empleado para la elaboración de la pulpa refinada de mora a partir de frutos enteros. Fuente: elaboración propia.

Se procesaron hojas de *Stevia rebaudiana* de la variedad Morita II, producida por un productor del sector Guayabita, de la localidad de Cagua, municipio de Sucre, del estado Aragua, Venezuela. Se removieron únicamente las hojas adultas de las ramas de plantas madres adultas (mayores de seis meses de edad), aprovechando las podas periódicas practicadas al cultivo para evitar su floración, en tres oportunidades diferentes (2 repeticiones). Al día siguiente de su recolección, fueron lavadas con abundante agua potable y deshidratadas en las instalaciones del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA) de la Universidad Central de Venezuela (por espacio de 8 horas a 50°C), hasta alcanzar una humedad final de 8 %. Luego fueron pulverizadas en un molinillo, marca Peabody, modelo Pe-mc9103; el tamaño de partículas fue regulado haciéndolas pasar por un tamiz

Afnor NFX11-501, el cual redujo las hojas a partículas menores o iguales a 500µm.

La determinación de la proporción de hojas de estevia en polvo a utilizar en la elaboración de los jugos se rigió por criterios sensoriales, para lo cual fue ejecutada con anterioridad una prueba de aceptabilidad, en donde se les suministró a los catadores tres jugos de mora elaborados a partir de tres concentraciones diferentes de hojas de estevia en polvo. La mencionada prueba fue efectuada en las instalaciones del laboratorio de evaluación sensorial de la Escuela de Tecnología de Alimentos de la Universidad de Costa Rica. Por otra parte, el nivel de dilución, así como las concentraciones de hojas de estevia máxima y mínima del jugo, fue definido en una prueba preliminar, efectuada en reuniones informales, con un panel entrenado de 8 personas,

integrantes del grupo de investigación del CITA, quienes son expertos en investigaciones orientadas al estudio de la mora, y en la que se le presentaron 5 diferentes concentraciones de estevia en el jugo en estudio, para que éstos indicaran la concentración máxima en la cual rechazan el gusto del jugo, a causa del regusto característico, y la concentración mínima en la cual aún se percibe acidez del jugo y por ende requiere mayor proporción de estevia para aumentar su dulzor.

Evaluación del tratamiento enzimático

Como estrategia para alcanzar una mayor extracción de los agentes edulcorantes (esteviolglucósidos) de las hojas, se evaluó un tratamiento enzimático en la pulpa refinada junto a las hojas de estevia en polvo. Por la composición del vegetal empleado, fueron evaluados cinco complejos enzimáticos:

- 1.- ®Pectinex Ultra SP-L (pectinasa – hemicelulasa - celulasa) de NOVOENZYMES, North America, Inc. (Franklinton, N.C., USA)
- 2.- ®Pectinex Ultra Clear (poligalacturonasa y pectinaliasa) de NOVOENZYMES, North America, Inc. (Franklinton, N.C., USA)
- 3.- ®Pectinex Ultra AFPL (pectinaliasa) de NOVOENZYMES, North America, Inc. (Franklinton, N.C., USA)
- 4.- ®ULTRAZYM AFP-L (pectinasa con actividad celulasa) de NOVOENZYMES A/S, Dinamarca. (Bagsvaerd, Denmark)
- 5.- ®MACEREX PM (celulasa y pectinasa) de ENMEX C.A., México.

Se aplicó un diseño experimental completamente aleatorizado, en el cual se evaluaron dos niveles de las dos variables consideradas (concentración de enzima y tiempo de incubación), en dos tipos de extracción: en agua y en pulpa de mora, con dos repeticiones. En el caso de la concentración de enzimas se estipuló la evaluación de 100

y 200ppm, tomando en cuenta que valores superiores podrían incrementar los costos de la operación, si se empleara a nivel industrial. Para el tiempo de incubación, se fijaron 15 y 30min, a fin de poder apreciar las diferencias entre los cocteles enzimáticos en los primeros minutos del tratamiento, en el cual ocurre la degradación e hidrólisis de forma acelerada. Los períodos de incubación en la pulpa de mora fueron realizados a 35°C, siguiendo algunas de las pautas especificadas por Montero (2008), quien corroboró una pérdida de aceptación sensorial del jugo de mora, luego de ser sometido a temperaturas superiores a este valor. A diferencia, la extracción en agua fue realizada a 50°C, temperatura recomendada por los fabricantes, por la mayor actividad enzimática, y dado que en esta matriz no hay riesgo de alterar sus cualidades organolépticas, como en el caso de la pulpa de mora. Para la realización del diseño se empleó el programa estadístico STATGRAPHICS Centurion versión XV. La aleatorización de las muestras se presenta en la Tabla 1.

Se estipularon dos blancos (muestras conformadas con jugo y estevia sin la adición de enzimas) para cada tiempo de tratamiento. Estas muestras fueron incorporadas al final de la Tabla 1. Las unidades experimentales del ensayo estuvieron constituidas por 50mL de zumo de mora, los cuales fueron trasvasados junto a 0,1g de hojas de estevia en polvo, y la dosificación del coctel enzimático a tubos de centrifuga plástico, dispuestos con tapas. Posteriormente fueron introducidos en un baño termostático con agitación. Las condiciones tanto de temperatura como de agitación serán exactamente iguales en todas las muestras.

Tabla 1.

Diseño del muestreo empleado para la evaluación de la extracción enzimática de esteviol glucósidos en la pulpa refinada de mora.

Bloque/corrida	Complejo enzimático	Código asignado para su identificación	Concentración de enzimas	Tiempo
1	Pectinex Spl	SPL-100-15	100ppm	15 min
1	Pectinex Afpl	AFPL-200-15	200ppm	15 min
1	Pectinex Afpl	AFPL-100-30	100ppm	30 min
1	Macerex pm	Mace -200-30	200ppm	30 min
1	Pectinex Clear	Clear-200-30	200ppm	30 min
1	Pectinex Clear	Clear-100-15	100ppm	15 min
1	Macerex Pm	Mace -100-15	100ppm	15 min
1	Ultrazym	Ultra-100-15	100ppm	15 min
1	Pectinex Spl	SPL-200-15	200ppm	15 min
1	Macerex pm	Mace-200-15	200ppm	15 min
1	Macerex pm	Mace-100-30	100ppm	30 min
1	Pectinex Clear	Clear-100-30	100ppm	30 min
1	Pectinex Afpl	AFPL-200-30	200ppm	30 min
1	Ultrazym	Ultra-100-30	100ppm	30 min
1	Pectinex Spl	SPL-100-30	100ppm	30 min
1	Pectinex Spl	SPL-200-30	200ppm	30 min
1	Ultrazym	Ultra-200-15	200ppm	15 min
1	Pectinex Clear	Clear-200-15	200ppm	15 min
1	Ultrazym	Ultra-200-30	200ppm	30 min
1	Pectinex Afpl	AFPL-100-15	100ppm	15 min
1	Blanco 1A	Blanco-15A	0ppm	15 min
1	Blanco 1B	Blanco-30A	0ppm	30 min
2	Pectinex Clear	Clear-200-15	200ppm	15 min
2	Pectinex Afpl	AFPL-200-15	200ppm	15 min
2	Ultrazym	Ultra-200-30	200ppm	30 min
2	Pectinex Clear	Clear-100-30	100ppm	30 min
2	Ultrazym	Ultra-200-15	200ppm	15 min
2	Macerex Pm	Mace -200-30	200ppm	30 min
2	Pectinex Spl	SPL-100-15	100ppm	15 min
2	Pectinex Afpl	AFPL-100-15	100ppm	15 min
2	Pectinex Spl	SPL-200-30	200ppm	30 min
2	Macerex Pm	Mace -100-15	100ppm	15 min
2	Ultrazym	Ultra-100-15	100ppm	15 min
2	Pectinex Afpl	AFPL-200-30	200ppm	30 min
2	Pectinex Clear	Clear-100-15	100ppm	15 min
2	Pectinex Spl	SPL-100-30	100ppm	30 min

Continúa página siguiente

Viene de la página anterior

2	Macerex Pm	MACE-200-15	200ppm	15 min
2	Ultrazym	ULTRA-100-30	100ppm	30 min
2	Pectinex Spl	SPL-200-15	200ppm	15 min
2	Pectinex Clear	CLEAR-200-30	200ppm	30 min
2	Pectinex Afpl	AFPL-100-30	100ppm	30 min
2	Macerex Pm	MACE-100-30	100ppm	30 min
2	Blanco 2A	BLANCO-15B	0ppm	15 min
2	Blanco 2B	BLANCO-30B	0ppm	30 min

Fuente: elaboración propia.

Finalizado el tiempo de tratamiento, fueron determinados los sólidos insolubles en suspensión, así como los sólidos solubles González, Tapia, Pérez, Dornier y Morel (2014a). Del mismo modo se tomaron 3 mL de la pulpa tratada, se filtraron (filtros desechables de 0,45µm) y se adicionaron 1,5mL a viales, para su análisis por HPLC. Como criterio de selección del tratamiento óptimo, se distinguió la combinación de condiciones que permitan extraer la mayor cantidad de los principales estevioglucósidos (estevióside y rebaudiósido A).

Cuantificación de esteviol glucósidos:

La identificación de los dos principales esteviol glucósidos presentes en las muestras analizadas (esteviosido y rebaudiósido A), fue realizada por cromatografía líquida (HPLC). Se utilizó un cromatógrafo marca Agilent Technologies, modelo 1200 series, acoplado a un espectrógrafo de masas marca Shimadzu GC-MS QP-2010. Para la toma de espectros UV-Vis se utilizó un espectrofotómetro UV-Vis (marca Thermo, modelo Genesys10UV), demandado por la naturaleza de la sustancia en estudio. Se empleó una columna RP C18 de 250 x 4,6 mm DI. La proporción de la fase móvil inyectada al equipo (proporción acetonitrilo:agua) fue de 80:20. Las muestras fueron filtradas (filtros de 0,45µm) antes de su análisis en el equipo descrito. Los cromatogramas permitieron apreciar y cuantificar la concentración de estevióside y rebaudiósido A presentes en las muestras, por medio de la comparación con soluciones estándar de ambos glucósidos.

Análisis estadístico de los resultados

Los resultados obtenidos durante las diferentes determinaciones fueron promediados y se les calculó la desviación estándar. De igual manera, para corroborar la existencia o no de diferencias estadísticamente significativas entre las muestras, se optó por el análisis de la varianza, y la prueba de Tukey para determinar la muestra diferente; se utilizó para ello el programa SigmaPlot versión 12.0 (SYSTAT Software Inc.), con un nivel de confiabilidad de 95 %.

Resultados y discusión

Análisis fisicoquímicos realizados en las pruebas de evaluación del método de extracción enzimático de jugo de mora

Los valores de sólidos insolubles en suspensión, así como el porcentaje de sólidos solubles registrados en cada una de las muestras del diseño experimental empleado, son presentados en la Tabla 2.

Con base en el análisis estadístico aplicado pueden señalarse las siguientes consideraciones:

1.- No hay diferencia estadísticamente significativa ($\leq 0,05$) entre los valores de sólidos solubles totales entre las muestras tratadas con los cinco preparados enzimáticos y las muestras testigo.

Tabla 2.

Valores de sólidos insolubles en suspensión y sólidos solubles totales registradas en los jugos bajo diferentes tratamientos de incubación enzimática.

ENZIMA	Concentración (ppm)	Tiempo (min)	SIS (g/100mL)	Sólidos solubles (g/100g)
Pectinex Spl	100	30	0,084 (0,00113) a	8,5 (0,00084) f
		60	0,044 (0,00092) a	7,8 (0,00090) f
	200	30	0,056 (0,00087) a	8,4 (0,0103) f
		60	0,039 (0,00091) a	8,3 (0,00087) f
Pectinex Afpl	100	30	0,013 (0,0009) b	8,9 (0,0093) f
		60	0,025 (0,00106) c	8,3 (0,00089) f
	200	30	0,024 (0,00104) d	8,9 (0,00091) f
		60	0,038 (0,00089) e	9,4 (0,00107) f
Pectinex Clear	100	30	0,054 (0,00103) a	8,1 (0,00096) f
		60	0,044 (0,0098) a	9,3 (0,00089) f
	200	30	0,066 (0,00094) a	8 (0,00088) f
		60	0,069 (0,00106) a	7,8 (0,00092) f
Ultrazym	100	30	0,059 (0,00093) a	8,3 (0,00104) f
		60	0,056 (0,00099) a	8,3 (0,00091) f
	200	30	0,077 (0,00108) a	8,8 (0,00095) f
		60	0,084 (0,00092) a	8,8 (0,00096) f
Blanco	0	30	0,044 (0,00090) a	8,8 (0,00082) f
	0	60	0,063 (0,00098) a	8,8 (0,00097) f

Nota: Letras distintas indican diferencias estadísticas según análisis ANOVA ($\leq 0,05$) y prueba de Tukey. Los valores expresados de SIS, así como los de sólidos solubles, son el resultado de promediar los valores de las tres muestras analizadas, en cada una de las condiciones del diseño experimental (ya que el ensayo se efectuó por triplicado).

Fuente: elaboración propia.

2.- No existe ningún efecto, ni en el tiempo de incubación enzimática, ni en el de concentración de complejo enzimático, sobre los valores resultantes de sólidos solubles totales.

3.- Existen diferencias estadísticamente significativas ($\leq 0,05$), sin posibilidad de ser generadas como producto de la casualidad, entre los valores de sólidos insolubles en suspensión entre las muestras, lo que corroboran un efecto en la concentración del complejo enzimático, así como del tiempo de incubación, del preparado

comercial Pectinex Ultra AFPL, con respecto al resto de las muestras evaluadas.

Es necesario destacar que los sólidos insolubles producidos en el jugo en estudio son generados en gran medida a causa del diseño del equipo empleado, ya que en la prensa hidráulica utilizada para la extracción del zumo de mora predominan las fuerzas de compresión, las cuales rompen las estructuras que retienen el jugo en grandes fragmentos (se puede diferenciar una mora de la otra). Brennan

(2006), clasifican el estándar de prensado o comprimido como una operación de separación sólido-líquido.

A pesar de ello no puede distinguirse un tratamiento que permita aumentar, en una magnitud notable, necesaria para su aplicación industrial, la concentración de sólidos solubles y así afirmar su participación en el aumento del rendimiento en procesos de filtración del jugo de mora. Sin embargo, y pese a los resultados obtenidos, González, Hernández & Vaillant (2017), Benavente (2013) y Montero (2008), comprobaron la efectividad de los complejos enzimáticos Pectinex Ultra Clear, y Pectinex AFPL, para el aumento de este parámetro, definiendo concentraciones de 150 y 250ppm, para la optimización de procesos de microfiltración tangencial del jugo de mora. Es oportuno destacar que, en el caso de los estudios referidos por Benavente (2013) y Montero (2008), evaluaron el comportamiento de los diferentes complejos enzimáticos incluso en el flujo obtenido luego de la aplicación de una operación de microfiltración tangencial a escala planta piloto. Valoraron además cuál de los tratamientos le permitía alcanzar valores de FRV y flujo de permeado más convenientes, a diferencia del caso en estudio, en el cual las muestras que conformaban el diseño experimental en este ensayo, no fueron microfiltradas, sino que se consideró, por su practicidad y por el elevado número de ensayos requeridos (18 muestras) la centrifugación de las mismas, y por ende el análisis del sobrenadante obtenido.

Estos resultados coinciden igualmente, con los generados por Montero (2008), Pessanha *et al.* (2011) y Monteiro, Viotto & Cabral (2011), quienes al evaluar diversos preparados comerciales, incluidos los utilizados en el presente estudio, determinaron un aumento en el rendimiento en la etapa de microfiltración

de jugo de mora, al emplear el mencionado complejo enzimático.

En consecuencia, se sugiere el preparado comercial Pectinex Ultra CLEAR, para el tratamiento enzimático previo del jugo, ya que éste ofreció mayor reducción de sólidos insolubles, así como la mayor cantidad de sólidos solubles totales, al visualizar los generados en las diferentes muestras; aspectos de gran trascendencia para evitar la oclusión de los poros generados en etapas posteriores de filtración del jugo.

Cuantificación de esteviol glucósidos en las muestras tratadas enzimáticamente

En las Tablas 3 y 4 se muestra la concentración en mg/mL de esteviósido y rebaudiósido A de las muestras tratadas con los diferentes preparados enzimáticos utilizados y cuya extracción fue realizada tanto en agua (a 50°C) como en jugo de mora (35°C). Dichos valores, fueron determinados por HPLC.

Estos resultados son igualmente presentados de forma gráfica en las Figuras 2 y 3, para esteviósido y rebaudiósido A respectivamente. En la Tabla 5, son presentados los p-valores resultantes del análisis estadístico efectuado. Con base en ellos se puede aseverar que para el caso de la extracción enzimática del esteviósido, tanto en los ensayos de extracción en jugo de mora como en agua, hay diferencias estadísticamente significativas (99 % de confiabilidad) al valorar los diferentes complejos enzimáticos empleados (los valores por ser inferiores a 0,01 son indicados en color rojo), y concretamente el binomio enzima*tiempo, sólo para el caso de la extracción en jugo de mora. Las concentraciones más altas de esteviósido y rebaudiósido A fueron alcanzadas empleando Pectinex Clear, a una concentración de 200ppm, durante 30 segundos.

Tabla 3.

Valores de esteviol glucósidos extraídos enzimáticamente en agua a 50°C.

Enzima	Concentración (ppm)	Tiempo (min)	[REB. A] (mg/mL)		[Esteviosido] (mg/mL)	
			Promedio	Des. Estándar	Promedio	Des. Estándar
Pectinex SPL	100	15	0,1317	0,0010	0,1339	0,0006
		30	0,1328	0,0035	0,1328	0,0024
	200	15	0,1276	0,0056	0,1350	0,0041
		30	0,1329	0,0023	0,1313	0,0005
Pectinex AFPL	100	15	0,1351	0,0013	0,1296	0,0019
		30	0,1335	0,0010	0,1267	0,0007
	200	15	0,1322	0,0022	0,1251	0,0012
		30	0,1375	0,0038	0,1274	0,0033
Pectinex CLEAR	100	15	0,1371	0,0036	0,1248	0,0096
		30	0,1409	0,0027	0,1092	0,0109
	200	15	0,1414	0,0087	0,1182	0,0160
		30	0,1423	0,0034	0,1217	0,0021
Ultrazym	100	15	0,1397	0,0017	0,1142	0,0018
		30	0,1443	0,0056	0,1206	0,0015
	200	15	0,1435	0,0014	0,1186	0,0037
		30	0,1395	0,0023	0,1035	0,0119
Macerex	100	15	0,1444	0,0010	0,1088	0,0023
		30	0,1437	0,0020	0,1075	0,0022
	200	15	0,1428	0,0042	0,1061	0,0010
		30	0,1472	0,0003	0,1110	0,0019
Blanco	0	15	0,1439	0,0023	0,1130	0,0031
	0	30	0,1448	0,0047	0,1183	0,0069

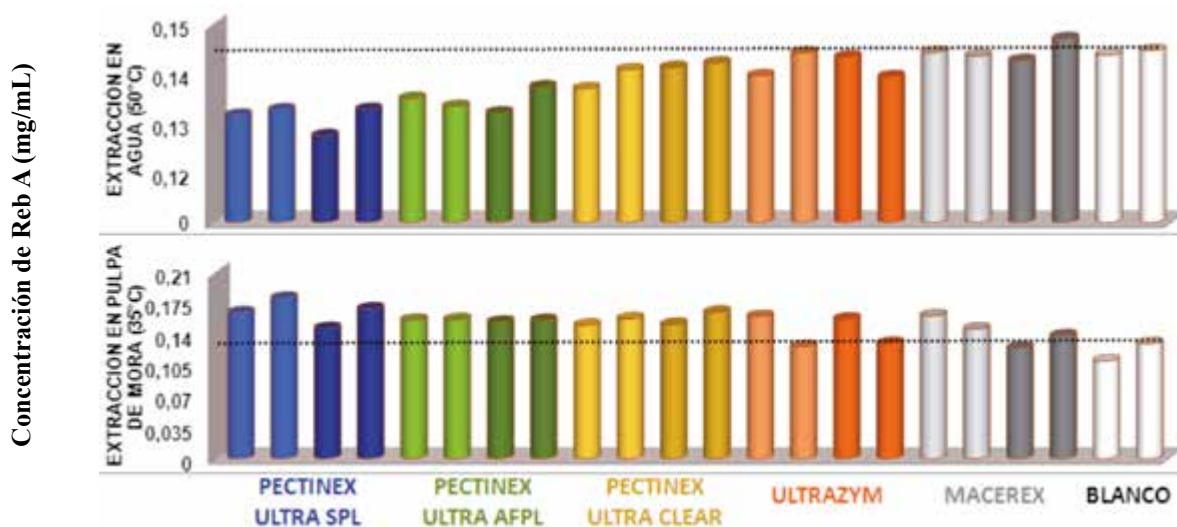
Fuente: elaboración propia.

Tabla 4.

Valores de esteviolglucósidos extraídos enzimáticamente en zumo de mora a 35°C.

Enzima	Concentración (ppm)	Tiempo (min)	[REB. A] (mg/mL)		[Estevióside] (mg/mL)	
			Promedio	Des. Estándar	Promedio	Des. Estándar
Pectinex SPL	100	15	0,1649	0,0127	0,0571	0,0121
		30	0,1811	0,0101	0,0551	0,0029
	200	15	0,1472	0,0027	0,0525	0,0102
		30	0,1694	0,0088	0,0605	0,0143
Pectinex AFPL	100	15	0,1564	0,0089	0,0698	0,0111
		30	0,1571	0,0076	0,0326	0,0207
	200	15	0,1542	0,0009	0,0536	0,0419
		30	0,1562	0,0095	0,0474	0,0539
Pectinex Clear	100	15	0,1507	0,0079	0,0612	0,0113
		30	0,1579	0,0113	0,0692	0,0097
	200	15	0,1515	0,0065	0,0690	0,0104
		30	0,1654	0,0051	0,0806	0,0051
Ultrazym	100	15	0,1605	0,0061	0,0463	0,0035
		30	0,1267	0,0115	0,0504	0,0095
	200	15	0,1577	0,0118	0,0498	0,0074
		30	0,1301	0,0074	0,0549	0,0174
Macerex	100	15	0,1614	0,0351	0,0972	0,0089
		30	0,1464	0,0176	0,0798	0,0053
	200	15	0,1250	0,0109	0,0801	0,0048
		30	0,1389	0,0008	0,0879	0,0009
Blanco	0	15	0,1102	0,0032	0,0533	0,0002
	0	30	0,1298	0,0042	0,0660	0,0204

Fuente: elaboración propia.

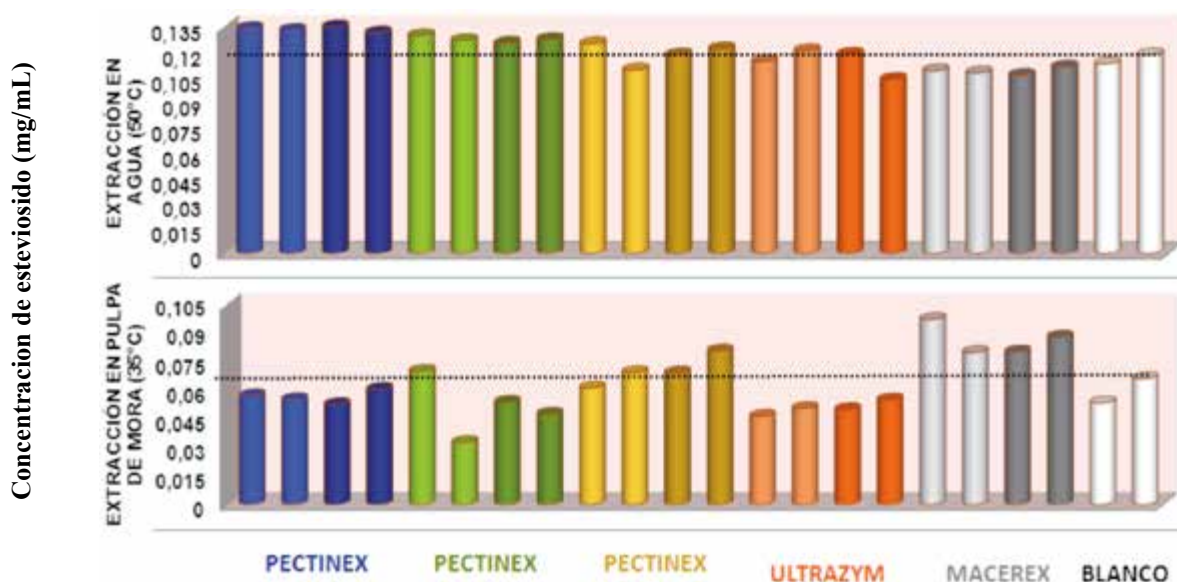


Preparados enzimáticos comerciales evaluados

Nota: ----- Línea de referencia: Concentración alcanzada por la muestra testigo (sin enzimas)

Figura 2. Concentración de rebaudiósido A extraído enzimáticamente en las dos matrices evaluadas: agua (50°C) y zumo de mora (a 35°C).

Fuente: elaboración propia.



Preparados enzimáticos comerciales evaluados

Nota: ----- Línea de referencia: Concentración alcanzada por la muestra testigo (sin enzimas)

Figura 3. Concentración de esteviosido extraído enzimáticamente en las dos matrices evaluadas: agua (50°C) y zumo de mora (a 35°C).

Fuente: elaboración propia.

Tabla 5.

Cuadro ANOVA, generado por el análisis estadístico de los valores de esteviol glucósidos en la extracción enzimática de los diferentes preparados comerciales en las dos matrices de jugo de mora evaluadas.

	Fuente de Variación	Valor P	
		Extracción en agua (50°C)	Extracción en mora (35°C)
REBAUDIÓSIDO A	Tipo de Enzima	<0,001	<0,001
	Concentración	0,768	0,090
	Tiempo de Tratamiento	0,100	0,318
	Enzima*Concentración	0,836	0,166
	Enzima*Tiempo	0,969	0,001
	Concentración*Tiempo	0,705	0,210
	Enzima*Concentración*Tiempo	0,263	0,804
STEVIÓSIDO	Tipo de Enzima	<0,001	0,003
	Concentración	0,615	0,777
	Tiempo de Tratamiento	0,563	0,908
	Enzima*Concentración	0,711	0,978
	Enzima*Tiempo	0,416	0,436
	Concentración*Tiempo	0,750	0,257
	Enzima*Concentración*Tiempo	0,046	0,919

Fuente: elaboración propia.

Con respecto a la extracción de rebaudiósido A, igual que para el esteviósido, los valores p resultaron inferiores a 0,05; empleando como medio de extracción tanto jugo como agua, lo que demuestra además una incidencia significativa al comparar el efecto simultáneo del tipo de enzima, la concentración y el tiempo de extracción.

A pesar de la comprobación estadística de las diferencias entre las concentraciones de esteviósido y rebaudiósido A entre muestras, y como puede apreciarse más claramente de forma visual a través de las Figuras 2 y 3, los valores obtenidos en los diferentes tratamientos son similares a las concentraciones cuantificadas en el blanco o muestra testigo, muestra compuesta por el medio, bien sea agua o jugo de mora, a la cual se le añadió la misma cantidad de hojas de estevia en polvo, y carece de enzimas, lo que permite apreciar una muy leve influencia de las enzimas en la extracción de ambos

esteviolglucósidos, incluso a pesar del uso, en el caso de la extracción en agua, de temperaturas superiores recomendadas por el fabricante del complejo enzimático, corroborando que la difusión de estos compuestos de las hojas al medio, ocurre principalmente por la solubilidad de los mismos, más que por la hidrólisis originada por las enzimas específicas empleadas en el estudio. Ello concuerda con los resultados obtenidos durante una prueba de evaluación sensorial, de tipo discriminativa, realizada para evaluar si el medio de extracción tiene un impacto en el gusto final de la bebida, en la cual no hubo ninguna influencia. Por tal motivo, es necesario considerar estudios más profundos sobre la extracción enzimática de esteviol glucósidos, en los que se estime el efecto de enzimas especializadas y afines con la naturaleza del sustrato (hojas de estevia), como la celulasa o hemicelulasa, las cuales reportan, según Puri, Sharma & Barrow (2012), mayores valores de extracción de esteviolglucósidos, a

fin de asegurar la factibilidad de su aplicación industrial con este propósito.

Otro hecho peculiar que resalta en los resultados obtenidos, es la mayor extracción de rebaudiósido A al emplear como medio de extracción el jugo de mora, incluso a una temperatura más baja (35°C), así como una mayor extracción de esteviósido en los ensayos cuando las extracciones se efectuaron en agua. Este suceso puede ser vinculado, tal y como lo señalan Chhaya, Mondal, Majumdar & Sirshendu (2012) y Chaturvedula & Prakash (2011), a la mayor solubilidad del glucósido rebaudiósido A, y sin duda, a la influencia del bajo pH (alrededor de 3,05 en el jugo de mora empleado), en la mayor extracción de este compuesto. Dadas las ventajas del rebaudiósido A, por su mejor perfil sensorial en la formulación de alimentos, esta incidencia resulta favorable para la elaboración de la bebida propuesta, por lo que se consideró establecer la extracción de esteviolglucósidos en el jugo de mora. Por último, y debido a que la extracción se efectuará en el jugo de mora, al cual será necesario mantener, previa a la microfiltración, por un lapso de 1 hora a 35°C, se incluirá un tratamiento enzimático con Pectinex Ultra Clear, a una concentración de 200ppm.

Conclusiones

De acuerdo con las deducciones de los análisis fisicoquímicos realizados en las pruebas de enzimación del jugo de mora, se puede afirmar que existe un efecto en la concentración del complejo enzimático, así como del tiempo de enzimación del preparado comercial Pectinex Ultra AFPL, con respecto al resto de los complejos enzimáticos evaluados. Sin embargo, a pesar de esta diferenciación, los valores de concentraciones de esteviósido y rebaudiósido A obtenidos, son similares a las concentraciones cuantificadas en el blanco o muestra testigo, lo que corrobora que la difusión de estos compuestos de las hojas al medio, ocurre

principalmente en las muestras evaluadas, por la solubilidad de los mismos, más que por la hidrólisis originada por las enzimas específicas empleadas en el estudio.

Referencias

- Brennan, J. (2006). *Manual del Procesado de los alimentos* (1er ed.) Zaragoza, España: Editorial Acribia.
- Benavente, L. (2013). *Production of ellagitannins concentrate by Uf-Nf from tropical highland blackberries*. (Tesis de Maestría). Universidad de Nova, Lisboa.
- Chaturvedula, V.S. & Prakash, I. (2011). A new diterpene glycoside from *Stevia rebaudiana*. *Molecules*, 16(4), 2937-2943. doi: 10.3390/molecules16042937
- Chhaya, R., Mondal, S., Majumdar, G.C. & Sirshendu, D.E. (2012). Clarifications of stevia extract using cross flow ultrafiltration and concentration by nanofiltration. *Separation and Purification Technology*. 89, 125-134. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2012.01.016>
- Durán, A., Rodríguez, S., Cordon, M., Record, C. y Jiniva, C. (2012). Estevia (*Stevia rebaudiana*), edulcorante natural y no calórico. *Revista Chilena de Nutrición*, 39(4), 203-206. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182012000400015>
- González, C., Hernández, L. & Vaillant, F. (2017). Analysis of juice blackberry (*Rubus adenotrichos*) sweetened with stevia (*Stevia rebaudiana Bertonii*), a metabolomics approach. *Revista Udeca Actualidad & Divulgación Científica*, 20(1), 121-129.
- González, A. y Moralejo, S. (2011). Aproximación a la comprensión de un endulzante natural alternativo, la *Stevia rebaudiana Bertonii*: producción, consumo y demanda potencial agroalimentaria. *Agroalimentaria*, 17(32), 57-69.
- González, C., Tapia, M., Pérez, E., Dornier, M. y Morel, G. (2014a). Caracterización de cultivares de *Stevia rebaudiana Bertonii* de diferentes procedencias. *Bioagro*, 26 (2); 79-88.

- González, C., Tapia, M., Pérez, E., Pallet, D., Dornier, M. (2014b). Main properties of steviol glycosides and their potential in the food industry: a review. *Fruits*, 69(2), 127-141. <https://doi.org/10.1051/fruits/2014003>
- Hamilton, V., Guzmán, E., Golusda, C., Lera, L. & Cornejo, V. (2013). Edulcorantes no nutritivos e ingesta diaria admisible en adultos y niños de peso normal y obeso de tres niveles socioeconómicos, y un grupo de diabéticos de la región metropolitana. *Revista Chilena de Nutrición*, 40 (2), 123-128. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182013000200005>
- Hart, M., & Huxsoll, C. (1989). *Microfiltration of enzyme-treated apricot puree*, *Quality factors of fruits and vegetables: Chemistry and Technology*. Washington, DC: American Chemical Society.
- Laverde, J. (2010). *Estudio de las condiciones óptimas para la obtención de jugo clarificado de arazá (Eugenia stipitata), mediante procesos enzimático y membranario*. (Tesis de grado). Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador.
- Madrid, A. (2001). *Nuevo Manual de Industrias Alimenticias* (3ra ed.) Madrid, España: Editorial Mundi Prensa
- Monteiro, F. S., Viotto, L. A. & Cabral, L. M. C. (2011). *Evaluation of anthocyanin content on blackberry juice (Rubus spp.) Processed by microfiltration*. Recuperado de: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/54283/1/2011-113.pdf>
- Montero, M. (2008). *Estudio del proceso para la elaboración de jugo clarificado de mora por microfiltración tangencial*. (Tesis de grado). Universidad de Costa Rica, San José.
- Pessanha, M. *et al.* (2011). Effect of enzymatic treatment on the viscosity of raw juice and anthocyanins content in the microfiltrated blackberry juice. *Desalination and Water Treatment*. 27(1-3), 37-41.
- Puri, M., Sharma, D. & Barrow, C. (2012). Optimisation of novel method for the extraction of steviosides from stevia rebaudiana leaves. *Food Chem.*, 132(3), 1113-1120. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.063>
- Vaillant, F. *et al.* (1999). Crossflow microfiltration of passion fruit juice after partial enzymatic liquefaction. *Journal of Food Engineering*, 42(4), 215-224. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(99\)00124-7](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(99)00124-7)