

Efecto de la acción enzimática en la hidrolización de elagitaninos e incremento de ácido elágico en mora, frambuesa y guayaba

Gustavo Xavier Galarza Aguirre

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**

Noviembre, 2017

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

Efecto de la acción enzimática en la hidrolización de elagitaninos e incremento de ácido elálgico en mora, frambuesa y guayaba

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar al título de Ingeniero en Agroindustria Alimentaria en el Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Gustavo Xavier Galarza Aguirre

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2017

Efecto de la acción enzimática en la hidrolización de elagitaninos e incremento de ácido elágico en mora, frambuesa y guayaba

Gustavo Xavier Galarza Aguirre

Resumen. La mora, frambuesa y guayaba son fuente de elagitaninos (ET). La hidrolización de estos ET genera ácido hexahidroxi-difenico, el cual es precursor de ácido elágico (EA). El objetivo de este estudio fue de evaluar la hidrolización enzimática de ET y la formación de EA en purés de tres frutas. Los ET fueron identificados en cada fruta (Fase 1). Luego, extractos de las frutas fueron hidrolizados con tanasa usándose un diseño de Bloques Completos al Azar con medidas repetidas en el tiempo para una medición de 24 horas (Fase 2). Por último, se usó un Diseño Completamente al Azar para evaluar la combinación de cuatro enzimas (pectinasa, pectinasa + tanasa, pectinasa + proteasa, pectinasa + tanasa + proteasa) en cada puré de frutas (Fase 3). En la fase 1 se identificaron 12 ET en total: seis en mora, tres en frambuesa y tres en guayaba. Otros elagitaninos fueron detectados pero no identificados. La mora presentó un alto contenido de ET y EA inicial (258.1 ± 12.7 y 18.68 ± 1.5 mg/L respectivamente). Luego de 24 horas de incubación, el contenido de EA fue alto en todas las frutas. La adición de pectinasa+tanasa incrementó el contenido de ácido elágico en mora (181.5 ± 46.4 mg/L). No existió diferencia en la formación de EA en frambuesa, y en guayaba disminuyó debido a la sedimentación. Es necesario realizar más estudios para identificar los ET formados durante la hidrolización enzimática y cuantificación de EA en sedimento luego de centrifugación.

Palabras clave: Pectinasa, procesamiento de frutas, tanasa, taninos hidrolizables.

Abstract. Blackberries, raspberries, and guavas are sources of ellagitannins (ET). Enzymatic hydrolyzation of ET can generate hexahydroxydiphenic acid, which is an ellagic acid (EA) precursor. The objective of this study was to evaluate various enzymatic ET hydrolyses and EA formation in three fruit purees. Initially, ETs were identified in each fruit (phase I). Then, extracts were hydrolyzed with tannase in a Randomized Block Design with measures repeated overtime for 24 hours (II). Finally, a Completely Randomized Design was used with four combinations of enzymes (pectinase, pectinase+tannase, pectinase+protease, pectinase+tannase+protease) evaluated on each fruit puree (III). Initially, 12 ETs were identified in blackberry (6), raspberry (3), and guava (3). Other ETs were detected but not identified (I). Blackberry presented the highest initial ET and EA concentrations (258.1 ± 12.7 & 18.68 ± 1.5 mg/L, respectively). EA formed during hydrolysis was similar in all fruits with best results observed at 24 hours of incubation (II). Highest EA was observed in blackberry regardless of enzyme treatment. The addition of pectinase aided in the tannase hydrolysis of blackberry ETs increasing EA formed (181.5 ± 46.4 mg/L). Similar results were observed with pectinase+protease (164.8 ± 47.3 mg/L) suggesting the occurrence of more EA in blackberry. In contrast, no difference was observed in the formation of EA in raspberry samples regardless of the enzymatic treatment applied and a decrease in EA present was observed in guava samples due to possible sedimentation (III). More studies need to be conducted to identify ETs formed during enzyme hydrolysis and to quantify EA in the sediments after centrifugation (clarification).

Key words: Fruit processing, hydrolyzable tannins, pectinase, tannase

CONTENIDO

Portadilla.....	i
Página de firmas.....	ii
Resumen.....	iii
Contenido.....	iv
Índice de Cuadros, Figuras y Anexos.....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	7
4. CONCLUSIONES	15
5. RECOMENDACIONES	16
6. LITERATURA CITADA	17
7. ANEXOS.....	21

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Incremento de contenido de ácido elágico durante los periodos de incubación..	8
2. Contenido de elagitaninos en la hora 0 y las 24 horas de incubación en cada fruto.....	9
3. Incremento de ácido elágico en cada fruta incubadas a diferentes combinación de enzimas.....	13

Figuras	Página
1. Estructura de Elagitaninos identificados en mora.....	7
2. Estructura de los Elagitaninos identificados en frambuesa.....	8
3. Estructura de los Elagitaninos identificados en guayaba.....	8
4. Cromatogramas de hora 0 y hora 24 de incubación de Tanasa en mora.....	11
5. Cromatograma de la hora 0 y hora 24 de incubación de Tanasa en frambuesa...	12
6. Cromatograma de hora 0 y hora 24 de incubación de Tanasa en guayaba.....	13

Anexos	Página
1. Aumento relativo de contenido de ácido elágico (mg/L) en cada fruta.....	21
2. Aumento relativo de contenido de ácido elágico (mg/L) en cada fruta durante la tercera fase.....	21
3. Cromatogramas de acción enzimática en puré de mora.....	22
4. Cromatogramas de acción enzimática en puré de frambuesa.....	23
5. Cromatogramas de acción enzimática en puré de guayaba.....	24
6. Curva de calibración de ácido elágico.....	25
7. Contenido final de ácido elágico en cada puré de fruta luego de 24 horas de incubación.....	26

1. INTRODUCCIÓN

El consumo de frutas y vegetales durante los últimos años ha ido incrementando gracias a la tendencia de comer saludable. Se han llevado a cabo estudios en los cuales se ha demostrado que el consumo de estos pueden reducir el índice de enfermedades crónicas, como el cáncer (Hager *et al.* 2008). Dentro de los compuestos estudiados en diferentes frutas y vegetales encontramos a los taninos, los cuales han atraído el interés por su capacidad de ser antivirales, antibacteriales y reducir la presencia de tumores (Khanbabaee y Ree 2001).

Los taninos son metabolitos polifenólicos secundarios de las plantas (Hager *et al.* 2008). Se dice que son secundarios ya que no cumplen funciones principales dentro del metabolismo de las plantas, como biosíntesis o biodegradación, pero cumplen funciones de protección hacia el ataque de herbívoros o enfermedades (Hagerman 2002). Estos, a su vez, poseen un alto peso molecular, además de que presentan grupos hidroxilos unidos a fenoles que permiten una interacción con proteínas, minerales y otras macromoléculas (Vázquez-Flores *et al.* 2012). También son causantes del sabor amargo y la astringencia de ciertas frutas y vegetales (Olivas-Aguirre F *et al.* 2014). Según Olivas, los taninos se clasifican en cuatro grupos: condensados, hidrolizables, florotaninos y complejos. También pueden ser clasificados dependiendo de sus propiedades estructurales, es decir, la resistencia que estos presenten hacia un tratamiento con agua a altas temperaturas, o con acción enzimática mediante uso de tanasa, encerrando a dos grupos muy representativos que son: condensados (los cuales no cambian su estructura si se aplican los tratamientos) e hidrolizables (Khanbabaee y Ree 2001).

Los taninos condensados o proantocianinas son polímeros de flavonoides y dos de los más estudiados son: flavan-3-ols (-)-epicatequina y (+)-catequina (Hagerman 2002). En cuanto a los taninos hidrolizables, estos son derivados del ácido gálico y encierra dos grupos muy importantes: los galotaninos y los elagitaninos (Hagerman 2002). Los elagitaninos son ésteres de ácido elágico (Olivas-Aguirre F *et al.* 2014), el cual ha generado interés en la comunidad científica por estar presente en frutas como fresas, frambuesas y granadas (Komorsky y Novak 2011).

El ácido elágico es una molécula cuyo peso molecular es de 302 g/mol y posee muchas propiedades biológicas tales como: antioxidante, anti-mutagénicas, antimicrobianas y también son inhibidores del virus de inmunodeficiencia humana (Sepúlveda *et al.* 2011). También previene la formación de tumores, ya que, tanto este, como los elagitaninos (los cuales poseen en su estructura ácido elágico) pueden interactuar con paredes celulares, o, formar compuestos con las proteínas para así prevenir la proliferación de las células metastásicas, las cuales son células cancerosas que migran de un órgano a otro (Sepúlveda *et al.* 2011).

Estudios relacionados, en cuanto a remoción de los taninos presentes en jugo de fruta, han demostrado que estos reducen la digestibilidad, inactivan enzimas digestivas, son tóxicos y además de la no deseada interacción con proteínas (Prinz y Lucas 2000). Además, se ha comprobado que con la hidrólisis de taninos por medio de la actividad enzimática reduce el amargor y la astringencia de los jugos, permite clarificación, y previene la formación de sedimento en los mismos (Srivastava y Kar 2009).

Tanasa, o tannin acyl hydrolase EC 3.1.1.20, es una enzima encargada de biodegradar los taninos hidrolizables, siendo más afín a los galotaninos, cuya hidrólisis produce glucosa y ácido gálico (Srivastava y Kar 2009). Por lo tanto, como una alternativa para la industria de procesamiento de jugos, se ha demostrado que la aplicación de tanasa reduce los efectos negativos de los taninos, como ejemplo el sabor amargo, además de que se mejora la calidad del jugo y también de reducir la formación de sedimento de jugos de frutas con alto contenido de taninos, como por ejemplo: granada, frambuesa y mora (Aguilar *et al.* 2007).

Los objetivos de este estudio fueron:

- Identificar elagitaninos en mora, frambuesa y guayaba.
- Evaluar la hidrólisis enzimática de los elagitaninos durante el tiempo de incubación.
- Identificar qué tratamiento de fruta y enzima obtuvieron un mejor incremento de ácido elágico después de 24 horas de incubación.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del estudio.

El estudio se realizó en el laboratorio de química de alimentos del departamento de nutrición y ciencia de los alimentos en la universidad de Texas A&M, ubicada en la ciudad de College Station, Estado de Texas, Estados Unidos.

Elaboración de extracto de polifenoles.

Se extrajeron polifenoles de la mora, frambuesa y guayaba para poder identificar los elagitaninos presentes. Las frutas se obtuvieron de la casa comercial H-E-B, College Station. Primero, se pesaron 500 g de cada fruta. El método de extracción fue el de separar las semillas de las frutas por medio de un filtro de maya, luego se licuaron las frutas en una solución 50:50 (acetona:etanol) hasta homogenización. Las semillas se trituraron en una solución 50:50 (acetona:etanol) con un triturador de la marca Power Gen serie 500, y luego se filtró esa solución (SS) a la solución de jugo sin semilla (SWS). Una vez hecho eso, la solución (SS + SWS) se evaporó, por medio del uso de un rotovapor R-210, de la marca Buchi, a una temperatura de 60 °C durante 15 minutos, a una velocidad de rotación de 60 revoluciones por minuto. El residuo, el cuál era agua, fue la solución extracto de los fenoles presentes.

Condiciones del equipo LC-MS.

Las condiciones del LC-MS para la lectura de muestras fueron las mismas para todo el estudio. Las condiciones iniciales del equipo, y con una inyección de 450 µl por minuto, consistió en un 95% de la fase móvil A, la cual era agua con 0.1% de ácido fórmico, y 5% de la fase móvil D, que era metanol en grado HPLC. Una vez establecida las condiciones iniciales se dio paso a la lectura de las muestras, inyectando durante 1 minuto las mismas concentraciones de las condiciones iniciales, luego de 5 minutos la fase A disminuyó a un 90%, y la fase D aumentó a un 10%. Pasado 25 minutos, la fase A disminuyó su concentración a 30%, y la fase D aumentó a un 70%, y así se mantuvo hasta 35 minutos de la lectura de las muestras. Y por último, después de 35 minutos, el equipo inyectó concentraciones de la fase A y fase D para reestablecer las condiciones iniciales y dar paso a la lectura de la siguiente muestra. Las presiones del equipo para inyección de la muestra se lograron gracias a una bomba de gas nitrógeno conectada directamente con el equipo (Talcott 2010).

Lectura de extractos en LC-MS para identificación de elagitaninos.

Los elagitaninos presentes en los extractos de los polifenoles se identificaron por medio del uso del equipo LC-MS conformado por el HPLC-PDA Thermo-Finnigan Surveyor para

identificación de picos de refracción, y, para lectura de masas, se usó el equipo LCQ Deca XP Max ion trap, que estuvo conectado directamente con el primer equipo. Todas las muestras obtenidas se filtraron por medio del uso de un filtro Whatman de 0.45 micrómetros para verterlos en viales y dar paso a la lectura de masas por medio del uso del equipo LC-MS. Se observó a una longitud de onda de 370 nm ya que un compuesto que posee en su estructura ácido elágico se encuentra cerca de esa longitud (Machado *et al.* 2002).

Curva de calibración de ácido elágico.

Para cuantificar el contenido de ácido elágico en las muestras de todo el estudio se elaboró una curva de calibración. Se usó ácido elágico en polvo grado HPLC con una pureza $\geq 95\%$ obtenido de la casa comercial Sigma. Esta curva se realizó cada vez que se requirió una lectura de muestras. Para elaborar la curva de calibración se prepararon muestras con concentraciones conocidas de ácido elágico, partiendo desde 100 mg/L hasta 3 mg/L. El solvente usado para disolver el analito (ácido elágico) fue metanol en grado HPLC. Una vez que se elaboraron las muestras, se dio paso a una lectura en el HPLC, donde se midió el nivel de absorbancia de cada concentración conocida de ácido elágico. A medida que aumentó la concentración del ácido elágico, aumentó su nivel de absorbancia. Los puntos obtenidos reflejaron una tendencia constante, que al momento de graficarlos y unirlos, se formó una recta cuya ecuación arrojó un valor $R^2 > 0.99$, para tener un amplio rango de confiabilidad. La ecuación de la recta se expresó de la siguiente manera:

$$Abc = mCA + b \quad [1]$$

En donde

Abc= área bajo la curva.

m = pendiente.

CA = concentración del ácido elágico en miligramos por litro (mg/L).

b = valor de la absorbancia cuando la concentración del analito es igual a 0

La concentración total de ácido elágico en el extracto de interés se midió con la ecuación de la recta obtenida por medio de la curva de calibración. El cromatograma resultante detectó diferentes picos, entre ellos, un pico de detección de ácido elágico, por lo tanto, se tomó el área que abarcó todo ese pico de reflexión. Una vez obtenida esa área, se despejó de la ecuación 1 la incógnita de concentración de ácido elágico, y se reemplazaron los datos que ya teníamos de cada incógnita (área bajo la curva, pendiente e intercepto). El dato obtenido se multiplicó por el factor de dilución (1/2) para obtener concentración real de ácido elágico en mg/L.

Aplicación e incubación de enzima tanasa en los extractos de frutas.

Se aplicó a los extractos de polifenoles la enzima tanasa a una concentración de 1:10 (extracto:enzima) y se incubaron durante determinado tiempo para observar incremento del contenido de ácido elágico en determinado tiempo. Primero, se preparó una solución buffer citrato de pH 5.5, con citrato de sodio 0.1M y ácido cítrico 0.1M (Gomori 2010). Luego, una solución 100 mg/L (enzima/buffer) fue elaborada, adicionando 100 mg de la enzima a 1 L de la solución buffer citrato de pH 5.5. Una vez obtenida la solución enzima:buffer, se

añadieron 800 µl de dicha solución a 200 µl de los extractos de fruta. Las muestras fueron incubadas durante 0, 1, 2, 6 y 24 horas a una temperatura de 37 °C (Rout and Banarjee 2006). Se elaboraron tres muestras por cada hora de medición. Para detener la acción enzimática se usó 1 ml de metanol. Una vez terminado el tiempo de incubación, las muestras se filtraron, por un filtro Whatman de 0.45 micrómetros en viales para su lectura en el LC-MS y se observó incremento en los picos de refracción de ácido elágico.

Elaboración de puré de frutas y separación de semillas.

La elaboración del puré de frutas consistió en pesar 1500 g de la fruta para luego licuar y triturar. Las semillas fueron separadas del puré y se obtuvo un puré de fruta sin semilla. Las semillas fueron trituradas para obtener una solución más homogénea. Se agregó 0.05 g/ml de azida de sodio al puré sin semilla y al triturado de semillas para evitar crecimiento microbiano, ya que este compuesto sirve como bacteriostático (Russo *et al.* 2008). Una vez determinado el tiempo en el cual el incremento de ácido elágico fue mayor en los extractos de polifenoles, se realizó la incubación, durante el mismo tiempo, de los purés de cada fruta bajo las mismas condiciones y a diferentes combinaciones enzimáticas. Luego, se obtuvo el jugo de cada fruto y se prepararon las muestras para su lectura en el LC-MS.

Adición de enzima pectinasa al puré de frutas sin semillas.

Las enzimas que se usaron fueron: Pectinasa + Tanasa, Pectinasa + Proteasa y Pectinasa + Proteasa + Tanasa. Todos los tratamientos contuvieron pectinasa. Esta enzima es muy importante en la industria de procesamiento de frutas, ya que pueden hidrolizar complejos de polisacáridos de las plantas, y son consideradas como un requisito para poder clarificar un jugo, así como de estabilizarlo y aumentar su calidad (Tapre y Jain 2014).

Al puré sin semillas se le midió el pH inicial, y luego se elevó el pH por medio del uso de un buffer de citrato pH = 7, hasta alcanzar pH entre 4.0 y 4.2, ya que se ha demostrado que a ese rango de pH la acción de la enzima tanasa es más eficiente (Rout y Banerjee 2006). Se agregó la enzima pectinasa, a una concentración de 0.007 ml por ml de puré. El puré con la enzima pectinasa se dividió en 6 tubos falcon de capacidad de 50 ml. Se vertió, en cada uno, 40 ml del puré.

Adición e incubación de enzima tanasa a la solución de semillas trituradas.

A la solución de semillas trituradas se le añadió 200 ml de buffer de citrato a pH = 7 (Lipinska *et al.* 2014), y también se le añadió tanasa a una concentración de 1 g/100 ml. Esa solución de semillas trituradas con tanasa y 200 ml de buffer a pH 7 se incubó durante 2 horas a una temperatura de 37 °C (Rout y Banerjee 2006).

Combinación de solución de semillas con tanasa y puré con pectinasa.

Una vez terminada la incubación de la solución de las semillas, los 200 ml se vertieron a una relación de 200 ml por cada 650 ml de puré sin semilla con pectinasa, quiere decir, 0.31 ml de solución de semillas con tanasa por 1 ml de puré sin semilla con pectinasa. Se mezcló y se dividió en 6 tubos falcon, al mismo volumen de 40 ml en cada tubo.

Adición de proteasa.

Para las muestras con proteasa se agregó una relación de 0.33 ml de proteasa por cada 40 ml de puré. La proteasa se añadió a 3 tubos falcon que contenían respectivamente: los purés con pectinasa sin semilla, los purés con la solución semilla y tanasa, y a los purés de la combinación de pectinasa y tanasa. La proteasa también es una enzima usada en la industria de procesamiento de jugos como alternativa al proceso de clarificación (Pinelo *et al.* 2010).

Incubación de los purés con las diferentes combinaciones enzimáticas.

Se procedió a incubar a 37 °C durante 24 horas. Luego de la incubación, se procedió a detener la acción enzimática por medio de un choque térmico, sometiendo los tubos falcon a agua a punto de ebullición durante 2 minutos hasta que la muestra se calentó, y luego se introdujeron los tubos en un recipiente con hielo, para que generar ese cambio de temperatura que detuvo la acción enzimática (Chaitanyakumar y Anbalagan 2016).

Obtención y clarificación de jugo para su posterior lectura en el LC-MS.

La fibra del jugo se separó por medio de un centrifugador, en el cual se colocaron las muestras, a una velocidad de 3500 revoluciones por minuto, durante 10 minutos, se expusieron las muestras para separar la fibra del jugo, y así reducir el nivel de turbidez (Liao *et al.* 2007). Se ha demostrado que el uso de centrifugado disminuye la cantidad de polifenoles (Yousefnezhad *et al.* 2017). Luego del proceso de centrifugación, la fibra de las frutas se sedimentó y el jugo clarificado era el sobrenadado que estaba separado completamente del sedimento. Una vez hecho esto las muestras se prepararon para su posterior lectura en el Thermo-Finnigan Surveyor HPLC-PDA, y para lectura de masas, LCQ Deca XP Max ion trap.

Diseño del estudio.

En la fase de aplicación e incubación de tanasa a los extractos de frutas se usó un diseño de Bloques Completos al Azar en el cual se midió el incremento de ácido elálgico durante la incubación de tanasa en los extractos de las tres frutas desde el tiempo 0 hasta las 24 horas y se observó si hubo una diferencia significativa entre frutas y el tiempo de incubación por medio de una prueba Tukey de separación de medias. El total de unidades experimentales que se analizó fueron 45.

En la fase de aplicación de una combinación enzimática a los purés de frutas se usó un Diseño Completamente al Azar con arreglo factorial, y una separación de medias de mínimos cuadrados, en donde se aplicaron a las tres frutas las cuatro combinaciones enzimáticas. Se establecieron 12 tratamientos, con un total de 36 unidades experimentales. En esta parte se evaluó el aumento de ácido elálgico y se observó si hubo una diferencia significativa entre los 12 tratamientos. También se identificó qué fruta bajo qué combinación de enzimas obtuvo un incremento significativo de ácido elálgico.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fase I. Identificación de Elagitaninos.

El método de extracción que se llevó a cabo tuvo una gran eficiencia ya que se aprovechó la capacidad de la acetona para extraer polifenoles (Boeing *et al.* 2014). El etanol se usó para reducir el alto contenido de polifenoles de bajo peso molecular (Do *et al.* 2014). La figura 1 y 2 representan las estructuras de elagitaninos identificados en mora y frambuesa respectivamente. La composición química de cada una de las bayas (mora y frambuesa) varía dependiendo de la variedad y la familia. La calidad de fruta es variable y algunos fenoles presentes en estas frutas son solubles en agua, recordando que estos extractos, después del proceso de evaporación, se concentra en agua, por lo tanto, pueden existir ciertos cambios e incluso pérdidas de estos compuestos durante el proceso de extracción y evaporación (Skrovankova *et al.* 2015).

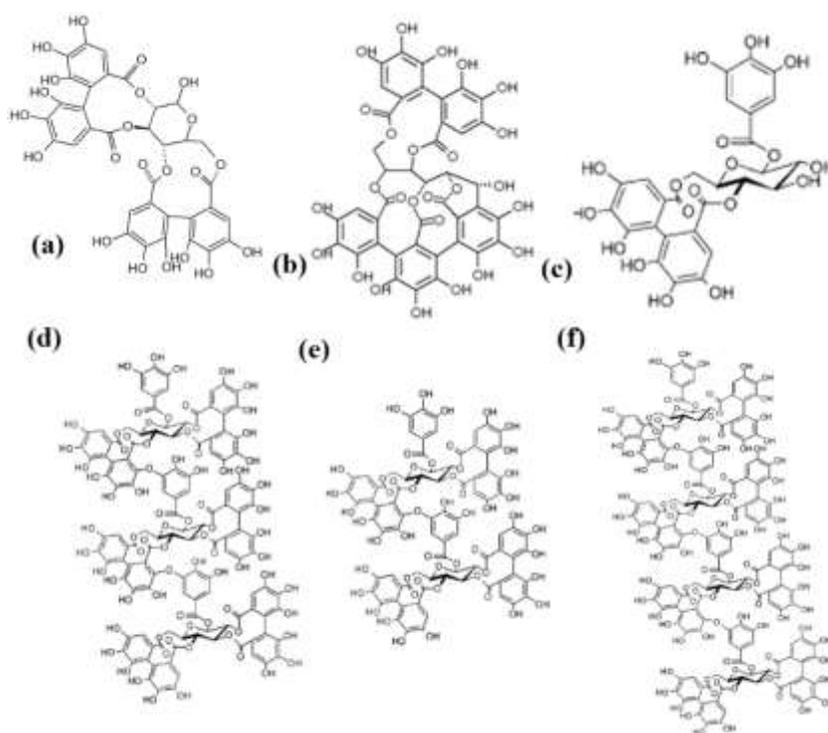


Figura 1. Estructura de los Elagitaninos identificados en mora: (a) penducalaganina, (b) castalaganina, (c) galloyl-HHDP-glucosa, (d) lambertanin D, (e) lambertanin C, (f) lambertanin A.

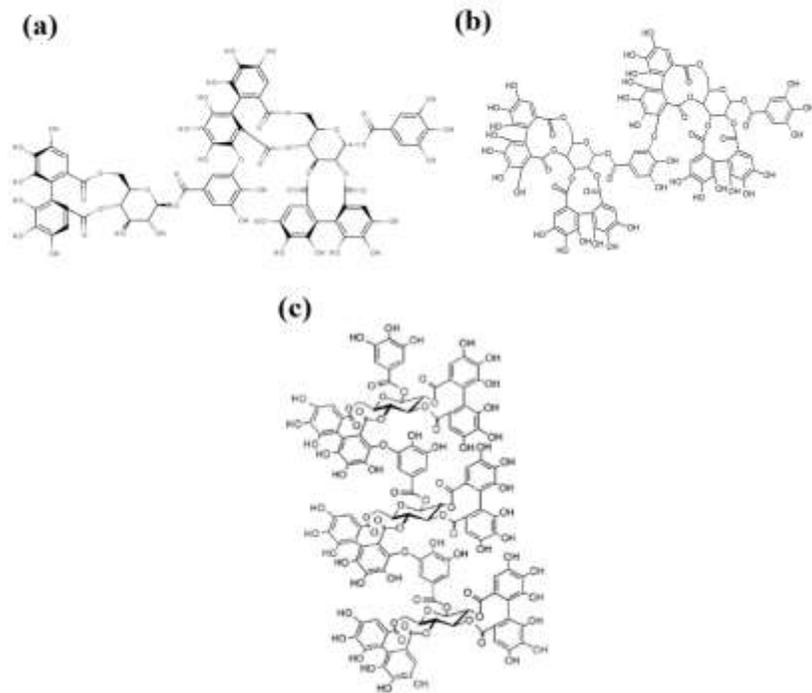


Figura 2. Estructura de los elagitaninos identificados en frambuesa: **(a)** sanguiin H-10, **(b)** sanguiin H-6, **(c)** lambertanin C.

En la figura 3 se encuentran los compuestos polifenólicos identificados en guayaba. Los elagitaninos identificados se basaron en un estudio similar en donde se usó una infusión de las hojas de la planta de guayaba, por lo tanto, se tomó el concepto de traspaso de características de la planta al fruto (Díaz-de-Cerio *et al.* 2015).

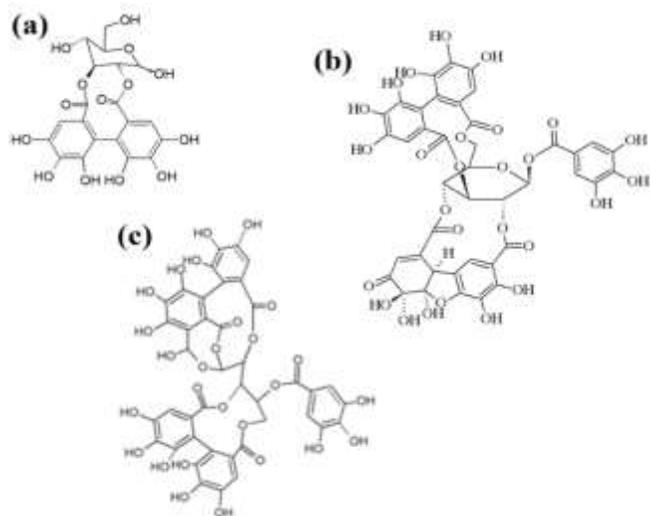


Figura 3. Estructura de los Elagitaninos identificados en guayaba: **(a)** isómero de HHDP-glucosa, **(b)** geranina, **(c)** causarinina.

Fase II. Aplicación y medición a diferentes tiempos de incubación de Tanasa a los extractos de frutas.

El cuadro 1 refleja el incremento de ácido elágico en cada fruta a medida que pasó el tiempo de incubación. No es necesario agregar la hora 0 ya que el cuadro sólo refleja incremento por hora, y la hora 0 tuvo un incremento de 0. La interacción tiempo y fruta fue significativo ($P < 0.05$), al igual que la diferencia estadística en cuanto al incremento de ácido elágico en cada una de las frutas. En guayaba, el incremento de ácido elágico no fue significativo luego de 2 horas de incubación. Esto se debe a que el contenido de ácido elágico y, también, de derivados de este, como los elagitaninos, son muy bajos, y por ende, se espera observar estos resultados (Díaz-de-Cerio *et al.* 2016). Pero, si se compara entre 1 y 24 horas de incubación del extracto de guayaba con la enzima tanasa, sí hubo diferencia estadística. Valores negativos reflejan precipitación del ácido elágico, ya que tiende a acumularse en el sedimento por su capacidad de no ser hidrosoluble (Sepúlveda *et al.* 2011). En los extractos de mora y frambuesa el incremento de ácido elágico a las 24 horas de incubación fue estadísticamente diferente a los otros tiempos. Las medias obtenidas en el incremento de ácido elágico en todas las frutas, luego de 24 horas de incubación, fueron estadísticamente iguales.

Cuadro 1. Incremento de ácido elágico (mg/L) durante los periodos de incubación.

Fruta	Tiempo (Horas)			
	1	2	6	24
Mora	$1.03^* \pm 2.75^{a(b)}$	$-7.37 \pm 0.12^{(b)}$	$0.33 \pm 4.93^{(b)}$	$21.5 \pm 9.39^{(a)}$
Frambuesa	$4.98 \pm 0.68^{(c)}$	$10.2 \pm 1.20^{(b)}$	$11.6 \pm 1.92^{(b)}$	$18.5 \pm 0.64^{(a)}$
Guayaba	$3.88 \pm 2.19^{(b)}$	$4.25 \pm 2.65^{(ab)}$	$5.63 \pm 3.18^{(ab)}$	$9.67 \pm 0.85^{(a)}$

*Media aritmética, ^a desviación estándar, ^(a,b,c) letra en la misma columna separa medias estadísticamente por medio de prueba Tukey ($P < 0.05$) por cada hora

El cuadro 2 refleja la disminución del contenido de elagitaninos en cada fruta, expresando contenido a las 0 horas y a las 24 horas. Los taninos sangüin H-6 y lambertanin C presentes en la frambuesa abarcan el 58% del total de compuestos químicos de la fruta (Borges *et al.* 2010). La mora es rica en polifenoles, y presenta una alta cantidad de elagitaninos y derivados del ácido elágico, inclusive mayor contenido inicial de ácido elágico (Kolniak-Ostek *et al.* 2015). Se pudo observar que en mora y frambuesa hubo una mejor hidrolización del contenido de elagitaninos en comparación con la guayaba.

La tanasa actúo en su sitio activo que son los enlaces éster que enlazan el ácido hexahidroxidifénico con moléculas de glucosa o ácido quínico para formar la estructura del elagitanino (Sepúlveda *et al.* 2011). Al romper estos enlaces éster, hubo generación de nuevos monómeros de elagitaninos de menor peso molecular y también de moléculas de ácido elágico (Arapitsas 2012). La estructura del elagitanino define la eficiencia de la tanasa, ya que, al ser una estructura más compleja, se dificulta la acción de la tanasa en el sitio activo, por lo tanto, se requirió más tiempo para hidrolizar la mayor cantidad posible de elagitaninos presentes (Aguilar *et al.* 2007).

Cuadro 2. Contenido de elagitaninos expresados en equivalente a ácido elálgico en la hora 0 y las 24 horas de incubación en cada fruto.

Fruta	Contenido de elagitaninos (equivalente a mg/L de ácido elálgico)	
	0 Horas	24 Horas
Mora	258* ± 12.6 ^a A	161 ± 9.65 A
Frambuesa	9.27 ± 1.00 B	7.46 ± 1.38 C
Guayaba	26.7 ± 8.68 B	42.4 ± 9.37 B

*Media aritmética, ^a desviación estándar, A, B, C en la misma fila separa medias estadísticamente por medio de prueba Tukey (P<0.05) por cada fruta.

En la figura 4 se observa el cromatograma de la mora que reflejó pérdidas de picos cerca de los 16 minutos, cuya longitud de onda de la observación fue de 370 nm. Los cambios en ambas curvas fueron notables. El pico de ácido elálgico tuvo un tiempo de retención de 22.35 minutos en el cromatograma (a) y 22.28 minutos en el cromatograma (b) mostró un diferencia a las 24 horas. El pico de tiempo de retención de 16.03 minutos en el cromatograma (a) tuvo un peso de 447 g/mol. Este compuesto se perdió en el cromatograma (b), ya que no reflejó este tiempo de retención o uno cercano, y además también se redujo el pico de reflexión a tiempo de 16.47, el cual fue un compuesto cuyo peso molecular fue de 464.63 g/mol. Esta pérdida de picos puede relacionarse con lo obtenido en el cuadro 2, que reflejó una disminución del contenido de elagitaninos en mora.

La figura 5 refleja los cambios que se presentaron en frambuesa en cuanto a incremento de ácido elálgico y disminución de elagitaninos. El aumento de contenido de ácido elálgico sí representó una gran diferencia entre la hora 0 (c) y la hora 24 (d), ya que el contenido inicial de los elagitaninos presentes en la frambuesa en sí es mucho más alto que la cantidad de ácido elálgico libre presente (Raudone *et al.* 2014). En comparación con mora, el aumento de ácido elálgico fue considerable, pero no hubo gran pérdida de otros picos, los cuales fueron otros compuestos no identificados. Esto se debió a que la tanasa en frambuesa hidrolizó oligómeros, los cuales formaron nuevos compuestos con el mismo peso molecular que otro elagitanino no identificado en la estructura de la frambuesa, y por eso no hubo disminución de ningún pico.

En la figura 6 se observa el comportamiento de la guayaba a las 24 horas de incubación. Se ha demostrado que hay un alto contenido de elagitaninos en las hojas de la guayaba, a las cuales se las ha atribuido propiedades curativas, antimicrobianas, nutricionales, y además que se han realizado prácticas para la elaboración de infusiones de té mediante las hojas (Biswas *et al.* 2013). No existen estudios en cuanto a evaluación de los elagitaninos presentes en el fruto de la guayaba, pero, con la formación de nuevos compuestos de elagitaninos se infirió que los taninos presentes en guayaba son más complejos que los taninos en mora y frambuesa, y que al momento de la acción de la tanasa, pudo actuar en estructuras de elagitaninos complejas, formando nuevos oligómeros de elagitaninos menos complejos, y que puedan requerir más tiempo de incubación para su completa hidrolización.

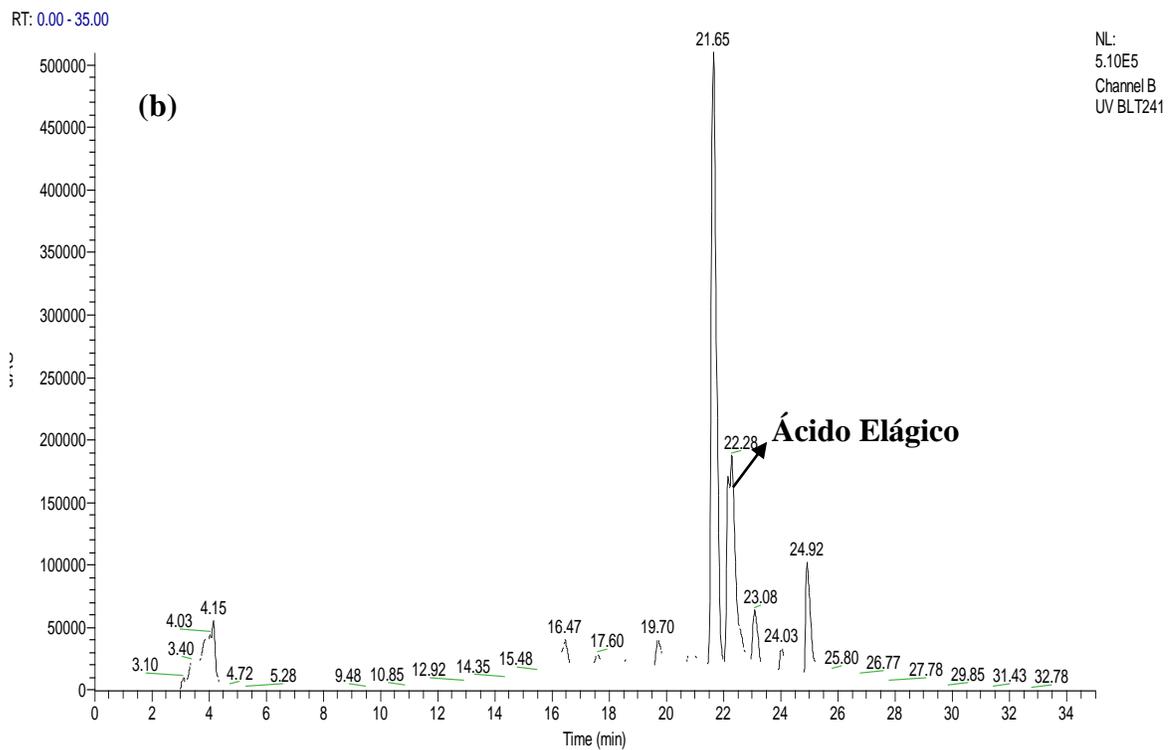
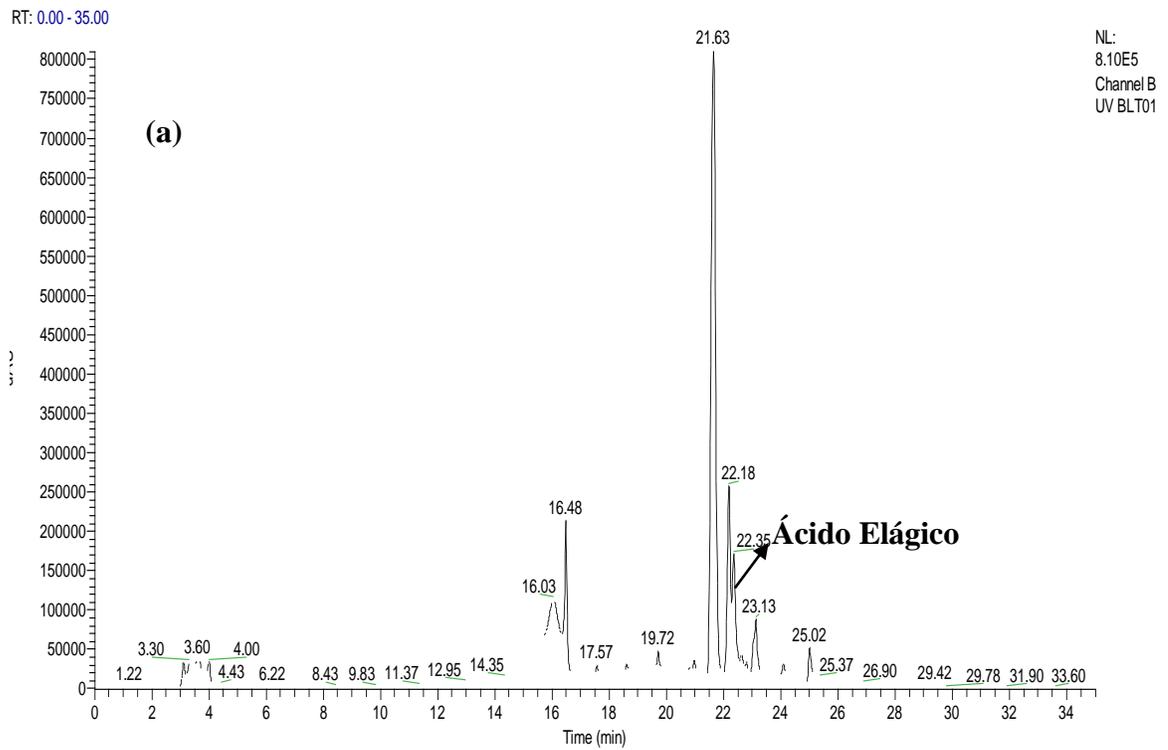


Figura 4. Cromatograma de la hora 0 (a) y hora 24 (b) de incubación de Tanasa en mora.

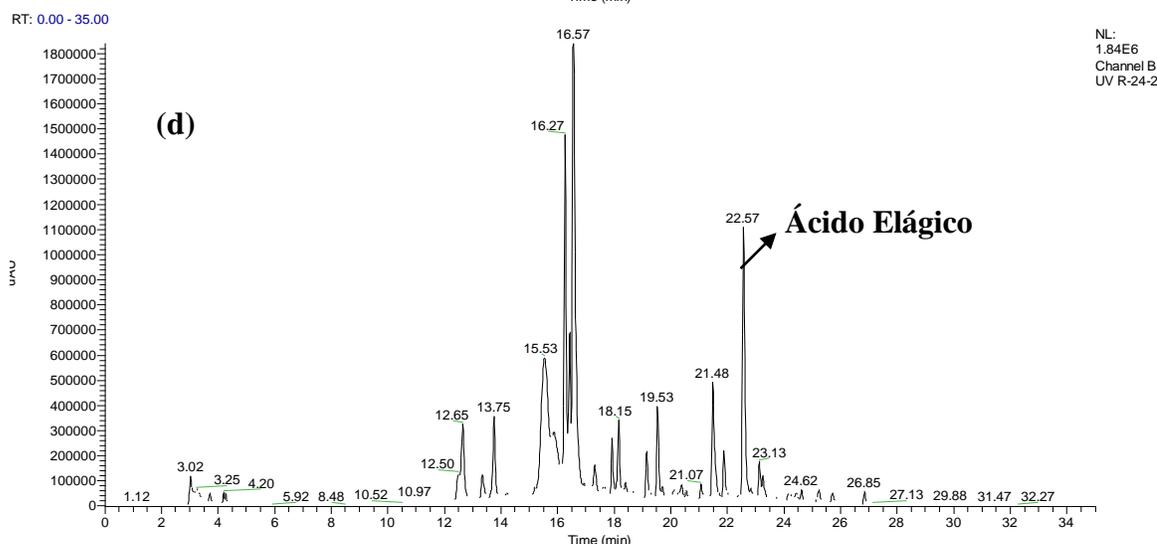
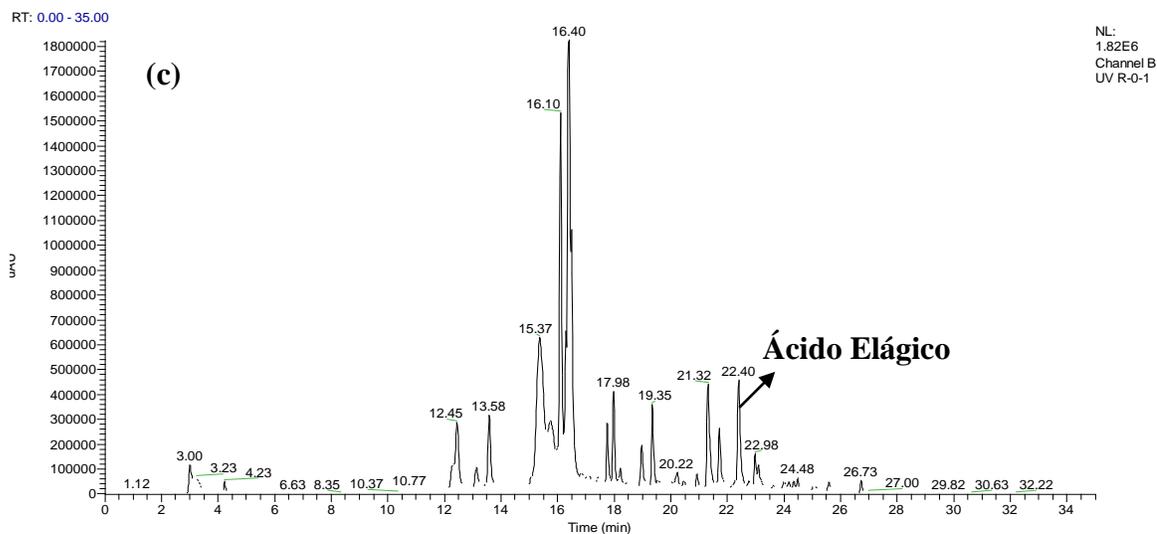


Figura 5. Cromatograma de la hora 0 (c) y hora 24 (d) de incubación de Tanasa en frambuesa.

En esta fase existió una interacción positiva con el tiempo en cuanto al aumento de contenido de ácido elágico ($P < 0.05$), esto indicó que a medida aumenta el tiempo de incubación aumenta el contenido de ácido elágico. También se observó que durante 24 horas de incubación hubo un mayor incremento de ácido elágico. Este tiempo medido se usó para la aplicación, y también, incubación de la enzima a los purés de la siguiente fase. Luego de 24 horas si se observa un incremento del pico de refracción de ácido elágico en comparación con el pico de la hora 0, pero, el tiempo óptimo de hidrolización total de los elagitaninos presentes es mayor, ya que, por lo reflejado en los cromatogramas y resultados, aún existían elagitaninos por hidrolizar, la formación de nuevos compuestos gracias a la ruptura de los enlaces éster que provoca la tanasa cuando reacciona con el elagitanino, ya que es su sitio activo. Los nuevos compuestos formados durante la hidrolización aún no han sido identificados, por ese motivo se los reporta como total de elagitaninos, ya que la longitud de onda que se observó fue de 370 nm, y eso representa una característica de los elagitaninos ya que son identificados a esa longitud de onda (Talcott y Lee 2002).

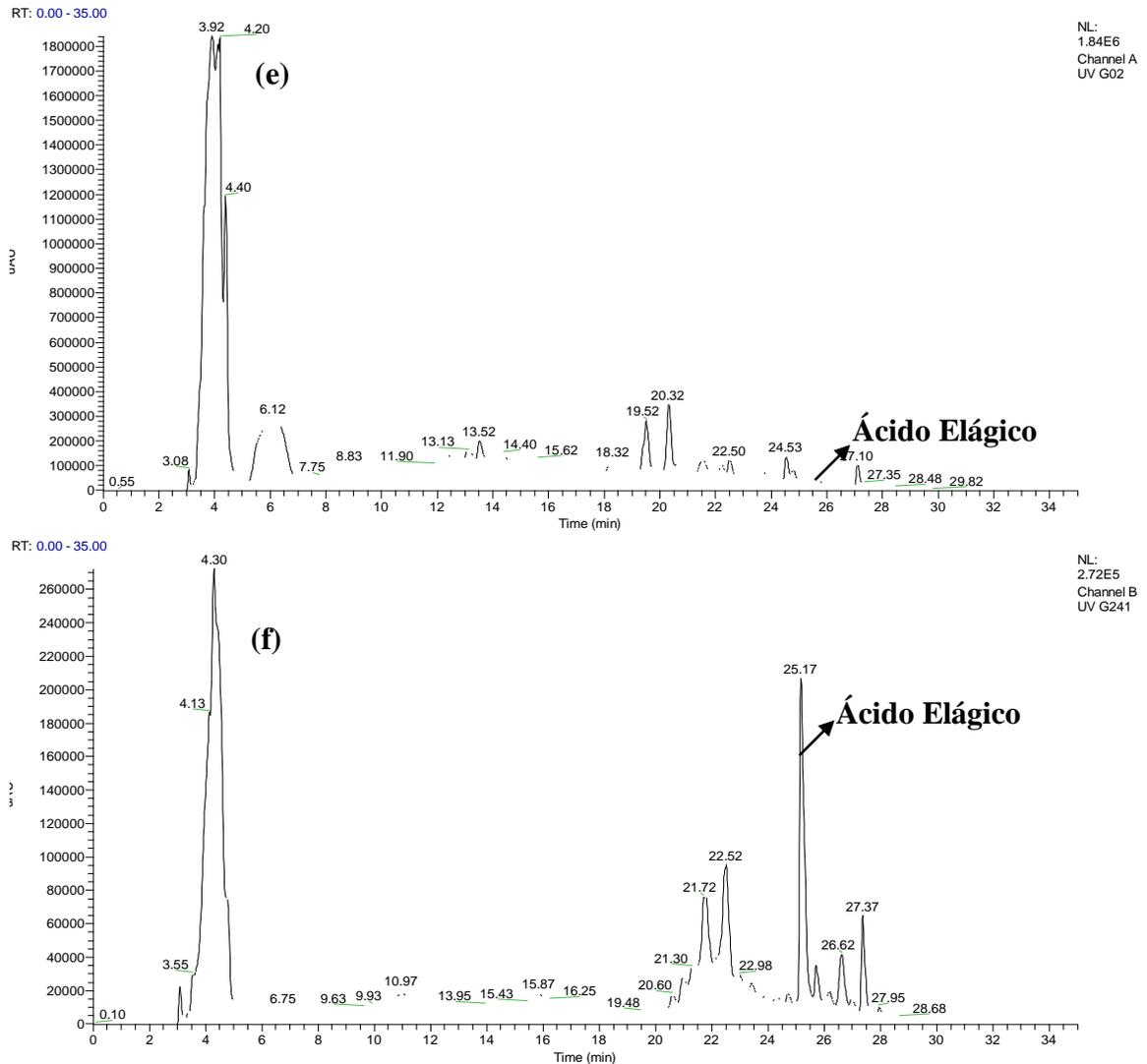


Figura 6. Cromatograma de la hora 0 (e) y hora 24 (f) de incubación de Tanasa en guayaba.

Fase III. Aplicación de tratamientos enzimáticos a los diferentes purés de frutas.

El cuadro 3 indica la separación de medias del aumento de contenido de ácido elágico obtenido en cada fruta incubada a determinada combinación de enzimas. La aplicación de enzimas a las frutas obtuvo resultados estadísticamente significativos. En cuanto al uso de las frutas se estableció que si existe diferencia estadística entre cada fruta ($P < 0.05$). También existió una diferencia estadística en cuanto a las enzimas, siendo la combinación pectinasa + tanasa la que reflejó un aumento de contenido de ácido elágico considerable. Según el método de separación de medias de esta fase, agrupa la combinación de enzimas pectinasa + tanasa y pectinasa + proteasa en la mora como medias semejantes, y también como las mejores medias en comparación con otra combinación de enzimas y frutas. El sedimento formado en el jugo de mora tiene un alto contenido de ácido elágico, por lo tanto, promover la hidrólisis de estos taninos ayudaría a evitar esta sedimentación. Además, el estudio relacionado también indica que la tanasa en mora no ha reducido significativamente el contenido de elagitaninos (Siriwoharn *et al.* 2005).

La mora obtuvo un aumento significativo en cuanto a contenido de ácido elálgico, contrario a frambuesa y guayaba. En guayaba el contenido de ácido elálgico no aumentó, más bien disminuyó. Esto se debe a que el ácido elálgico tiende a precipitarse por reacciones de oxidación que incrementa cuando la fibra de la fruta se ve afectada, gracias a procesos como cocinado o licuado (Häkkinen *et al.* 2000). En cuanto a tratamientos con proteasa, en especial frambuesa y guayaba, hubo una reducción también del contenido de ácido elálgico, y eso se debe a que la proteasa evita esa interacción entre proteína y poli-fenoles (Pinelo *et al.* 2010), además de que las enzimas son proteínas con capacidad catalítica, y la presencia de proteasa inactivó a la enzima tanasa, por lo tanto, en la combinación de las tres enzimas hubo una interacción entre tanasa y proteasa que provocó una inactivación ya que, se observó que estadísticamente en mora se agrupa la media obtenida en esta combinación de enzimas es igual a la media obtenida sólo con la enzima tanasa.

Cuadro 3. Incremento de ácido elálgico (mg/L) en cada puré de fruta incubadas a diferentes combinaciones de enzimas.

Frutas	Enzima			
	Pectinasa	Pectinasa + Tanasa	Pectinasa + Proteasa	Pectinasa+Tanasa + Proteasa
	50.3* ± 13.3 ^a B	144 ± 43.6A	128 ± 44.5A	44.1 ± 8.91B
Frambuesa	7.14 ± 3.14C	12.7 ± 3.41C	-7.02 ± 1.28CD	-8.17 ± 1.93CD
Guayaba	-30.8 ± 7.05D	-62.6 ± 6.41E	-65.1 ± 3.01E	-84.6 ± 4.38E

*Media aritmética, ^a desviación estándar, (A, B, C, D, E) letra que separa medias estadísticamente por medio de mínimos cuadrados (P<0.05).

Estos resultados demostraron que se puede aumentar la funcionalidad del jugo de mora, ya que aumenta el contenido del ácido elálgico, el cuál es un metabolito muy beneficioso para nuestra salud, además de promover la clarificación y mantener calidad de los jugos. Comparando las tres frutas, la mora, por su estructura, responde mejor a la interacción con la enzima tanasa, logrando aumentar el contenido de ácido elálgico, recordando que la mora ha sido la mejor fruta evaluada en este estudio, ya que obtuvo gran cantidad de ácido elálgico y también de elagitaninos los cuales se observó que la tanasa pudo hidrolizar en su gran mayoría. Aunque, la combinación de pectinasa + proteasa también favoreció a mora, pero aquí sólo se liberó ácido elálgico ya que la proteasa impide la interacción entre pectina y proteína, por lo cual reduce la sedimentación, y esto pudo haber liberado más ácido elálgico, y por ende aumentar la presencia del mismo en el jugo de mora. La frambuesa también reflejó resultados esperados, aunque las medias de todas las combinaciones de enzimas fueron agrupadas como estadísticamente semejantes. Por otro lado, la guayaba reflejó resultados negativos, los cuales no significaron pérdida, sino que el ácido elálgico se precipitó gracias a que la estructura de la fruta, al poseer demasiada fibra, es muy difícil de romper, por lo tanto, esto ocasionó que los compuestos presentes en la guayaba sean difíciles de liberar. Durante el proceso de sedimentación en los jugos se forma una red tridimensional, gracias a la interacción entre pectina y los polifenoles, que atrapa compuestos del jugo, siendo uno de estos el ácido elálgico.

4. CONCLUSIONES

- Se identificaron 12 elagitaninos en mora, frambuesa y guayaba.
- En mora se observó una alta concentración de ácido elágico y elagitaninos.
- El incremento de ácido elágico durante 24 horas fue alto en los extractos de polifenoles de las frutas ya que a ese tiempo se incubó la enzima tanasa a una temperatura de incubación de 37 °C.
- En mora hubo un considerable incremento en porcentaje, aumentando por cinco veces el contenido inicial de ácido elágico, específicamente usando la combinación de enzimas pectinasa + tanasa y pectinasa + proteasa.
- No se observó diferencia estadística en cuanto a aplicación de enzimas en el puré de frambuesa, y existió una sedimentación en las muestras de guayaba que hicieron que el ácido elágico presente en la guayaba quede retenido en el sedimento.

5. RECOMENDACIONES

- Identificar nuevos compuestos que se formaron durante la hidrolización de elagitaninos, así como los elagitaninos que se involucraron durante el proceso de hidrolización.
- Realizar mediciones arriba de 24 horas hasta llegar a un punto en donde ya no exista más sustrato (elagitaninos) para la enzima.
- Realizar estudios de vida de anaquel para observar cambios de la calidad de los jugos obtenidos.
- Realizar estudios *in-vitro* con animales vivos para observar si el metabolito (ácido elágico) llega hasta el intestino delgado.

6. LITERATURA CITADA

Aguilar CN, Rodriguez R, Gutierrez-Sanchez G, Augur C, Favela-Torres E, Prado-Barragan LA, Ramirez-Coronel A, Contreras-Esquivel JC. 2007. Microbial tannases: advances and perspectives. *Applied Microbiology Biotechnology*; [citado 2017 feb 16]. 76(1):47–59. eng. doi:10.1007/s00253-007-1000-2.

Arapitsas P. 2012. Hydrolyzable tannin analysis in food. *Food Chemistry*; [citado 2017 abr 12] 135(3):1708–1717. eng. doi:10.1016/j.foodchem.2012.05.096.

Biswas B, Rogers K, McLaughlin F, Daniels D, Yadav A. 2013. Antimicrobial Activities of Leaf Extracts of Guava (*Psidium guajava L.*) on Two Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria. *International Journal of Food Microbiology*; [citado 2017 mar 16] 2013:746165. eng. doi:10.1155/2013/746165.

Boeing JS, Barizao EO, E. Silva BC, Montanher PF, de Cinque Alemida V, Visentainer JV. 2014. Evaluation of solvent effect on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities from the berries: application of principal component analysis. *Chemistry Central Journal*; [citado 2017 abr 12]. 8(48):1–9. <http://journal.chemistrycentral.com/content/8/1/48>.

Borges G, Degeneve A, Mullen W, Crozier A. 2010. Identification of flavonoid and phenolic antioxidants in black currants, blueberries, raspberries, red currants, and cranberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; [citado 2017 jun 19]. 58(7):3901–3909. eng. doi:10.1021/jf902263n.

Chaitanyakumar A, Anbalagan M. 2016. Expression, purification and immobilization of tannase from *Staphylococcus lugdunensis* MTCC 3614. *AMB Express*; [citado 2017 mar 3]. 6(1):89. eng. doi:10.1186/s13568-016-0261-5.

Díaz-de-Cerio E, Verardo V, Gómez-Caravaca A, Fernández-Gutiérrez A, Segura-Carretero A. 2016. Exploratory Characterization of Phenolic Compounds with Demonstrated Anti-Diabetic Activity in Guava Leaves at Different Oxidation States. *International Journal of Molecular Science*; [citado 2017 may 25]. 17(5):699. doi:10.3390/ijms17050699.

Díaz-de-Cerio E, Verardo V, Gómez-Caravaca AM, Fernández-Gutiérrez A, Segura-Carretero A. 2015. Determination of Polar Compounds in Guava Leaves Infusions and Ultrasound Aqueous Extract by HPLC-ESI-MS. *Journal of Chemistry*; [citado 2017 abr 12]. 2015(44):1–9. doi:10.1155/2015/250919.

Do QD, Angkawijaya AE, Tran-Nguyen PL, Huynh LH, Soetaredjo FE, Ismadji S, Ju Y-H. 2014. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of Food and Drug Analysis*; [citado jul 27]. 22(3):296–302. doi:10.1016/j.jfda.2013.11.001.

Gomori G. 2010. Preparation of Buffers for Use in Enzyme Studies. In: Lundblad RL, Macdonald F, editors. *Handbook of biochemistry and molecular biology*. 4th ed. Boca Raton, Fla.: CRC; London: Taylor & Francis [distributor]. p. 721–724.

Hager TJ, Howard LR, Liyanage R, Lay JO, Prior RL. 2008. Ellagitannin composition of blackberry as determined by HPLC-ESI-MS and MALDI-TOF-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; [citado 2017 abr 12]. 56(3):661–669. eng. doi:10.1021/jf071990b.

Hagerman AE. 2002. *The Tannin Handbook, Biological Activity of Tannins*. Miami University. [place unknown]: Oxford, Ohio, USA. <http://www.users.miamioh.edu/hagermae/>.

Häkkinen SH, Kärenlampi SO, Mykkänen HM, Heinonen IM, Törrönen AR. 2000. Ellagic acid content in berries: Influence of domestic processing and storage. *European Food Research and Technology*; [citado 2017 jul 8]. 212(1):75–80. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s002170000184.pdf>. doi:10.1007/s002170000184.

Khanbabaee K, Ree T. 2001. Tannins: Classification and Definition. *Natural Products Report*; [citado 2017 feb 17] 18(6):641–649. doi:10.1039/b101061l.

Kolniak-Ostek J, Kucharska AZ, Sokół-Łętowska A, Fecka I. 2015. Characterization of phenolic compounds of thorny and thornless blackberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; [citado 2017 abr 12]. 63(11):3012–3021. eng. doi:10.1021/jf5039794.

Komorsky S, Novak I. 2011. Determination of Ellagic Acid in Strawberries, Raspberries and Blackberries by Square-Wave Voltammetry. *International Journal of Electrochemical Science*; [citado 2017 feb 7]. 6:4638–4647. <http://www.electrochemsci.org/papers/vol6/6104638.pdf>.

Liao H, Sun Y, Ni Y, Liao X, Hu X, Wu J, Chen F. 2007. The Effect of enzymatic mash treatment, pressing, centrifugation, homogenization, deaeration, sterilization and storage on carrot juice. *Journal Food Process Engineering*; [citado 2017 abr 21] 30(4):421–435. doi:10.1111/j.1745-4530.2007.00118.x.

Lipinska L, Klewicka E, Sójka M. 2014. Structure, occurrence and biological activity of ellagitannins: a general review; [citado 2017 jul 16]. 3(13):289–299. http://www.food.actapol.net/pub/7_3_2014.pdf.

Machado TdB, Leal ICR, Amaral ACF, Santos KRNd, Silva MGd, Kuster RM. 2002. Antimicrobial Ellagitannin of *Punica granatum* Fruits. *Journal of the Brazilian Chemical Society*; [citado 2017 mar 20] 13(5):606–610. doi:10.1590/S0103-50532002000500010.

- Olivas-Aguirre F, Wall-Medrano A, Gonzalez-Aguilar G, Lopez-Diaz JA, Alvarez-Parrilla E, La Rosa LA de, Ramos-Jimenez A, Olivas-Aguirre FJ, Wall-Medrano A, Gonzalez-Aguilar GA. 2014. Taninos hidrolizables; bioquímica, aspectos nutricionales y analíticos y efectos en la salud [Hydrolyzable tannins; biochemistry, nutritional & analytical aspects and health effects]. *Nutritional Hospital*. 31(1):55–66. spa. doi:10.3305/nh.2015.31.1.7699.
- Pinelo M, Zeuner B, Meyer AS. 2010. Juice clarification by protease and pectinase treatments indicates new roles of pectin and protein in cherry juice turbidity. *Food and Bioproducts Processing*; [citado 2017 abr 12] 88(2-3):259–265. doi:10.1016/j.fbp.2009.03.005.
- Prinz JF, Lucas PW. 2000. Saliva tannin interactions. *Journal of Oral Rehabilitation*; [citado 2017 abr 12] 27(11):991–994. doi:10.1111/j.1365-2842.2000.00578.x.
- Raudone L, Bobinaite R, Janulis V, Viskelis P, Trumbeckaite S. 2014. Effects of raspberry fruit extracts and ellagic acid on respiratory burst in murine macrophages. *Food Functional*; [citado 2017 jun 2] 5(6):1167–1174. eng. doi:10.1039/c3fo60593k.
- Rout S, Banerjee R. 2006. Production of tannase under mSSF and its application in fruit juice debittering. *The national alliance for insurance education and research*; [citado 2017 feb 28]. 5(3):346–350. <http://hdl.handle.net/123456789/5594>.
- Russo I, Del Mese P, Viretto M, Doronzo G, Mattiello L, Trovati M, Anfossi G. 2008. Sodium azide, a bacteriostatic preservative contained in commercially available laboratory reagents, influences the responses of human platelets via the cGMP/PKG/VASP pathway. *Clinical Biochemistry Journal*; [citado 2017 jul 20]. 41(4-5):343–349. eng. doi:10.1016/j.clinbiochem.2007.10.012.
- Sepúlveda L, Ascasio A, Rodríguez-Herrera R, Aguilera-Carbó A, Aguilar Cristóbal. 2011. Ellagic acid: Biological properties and biotechnological development for production processes. *African Journal of Biotechnology*; [citado 2017 feb 7]. 10(22):4518–4523. <http://www.academicjournals.org/AJB>.
- Siriwoharn T, Wrolstad RE, Durst RW. 2005. Identification of Ellagic Acid in Blackberry Juice Sediment. *Journal of Food Science*; [citado 2017 mar 4]. 70(3):C189-C197. doi:10.1111/j.1365-2621.2005.tb07124.x.
- Skrovankova S, Sumczynski D, Mlcek J, Jurikova T, Sochor J. 2015. Bioactive Compounds and Antioxidant Activity in Different Types of Berries. *International Journal of Molecular Science*; [citado 2017 jun 25]. 16(10):24673–24706. eng. doi:10.3390/ijms161024673.
- Srivastava A, Kar R. 2009. Characterization And Application Of Tannase Produced By *Aspergillus Niger* ITCC 6514.07 On Pomegranate Rind. *Brazilian Journal of Microbiology*; [citado 2017 jul 2]. 40(4):782–789. eng. doi:10.1590/S1517-83822009000400008.

Talcott S. 2010. High Performance Liquid Chromatography. In: Nielsen SS, editor. Food analysis laboratory manual. 2nd ed. New York, London: Springer. p. 145–154 (Food science text series).

Talcott ST, Lee J-H. 2002. Ellagic Acid and Flavonoid Antioxidant Content of Muscadine Wine and Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; [citado 2017 may 25]. 50(11):3186–3192. doi:10.1021/jf011500u.

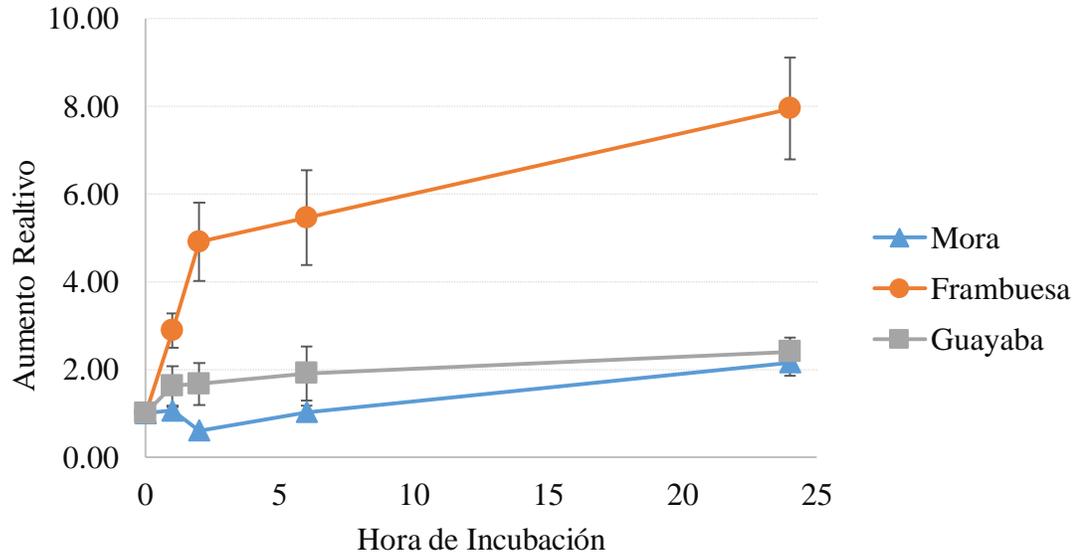
Tapre AR, Jain RK. 2014. Pectinase: Enzymes for fruit processing industry. *International Food Research Journal*; [citado 2017 jul 8]. 21(2). [http://www.ifrj.upm.edu.my/21%20\(02\)%202014/3%20IFRJ%2021%20\(02\)%202014%20Tapre%202013%20453.pdf](http://www.ifrj.upm.edu.my/21%20(02)%202014/3%20IFRJ%2021%20(02)%202014%20Tapre%202013%20453.pdf).

Vázquez-Flores AA, Alvarez-Parrilla E, Lopez-Diaz JA, Wall-Medrano A, La Rosa LA de. 2012. Taninos hidrolizables y condensados: naturaleza química, ventajas y desventajas de su consumo; [citado 2017 feb 1]. VI(2):84–93. https://www.researchgate.net/profile/Emilio_Alvarez-Parrilla/publication/264237320_Taninos_hidrolizables_bioquimica_aspectos_nutricionales_y_analiticos_y_efectos_en_la_salud/links/53f6b9a60cf22be01c4516e6.pdf.

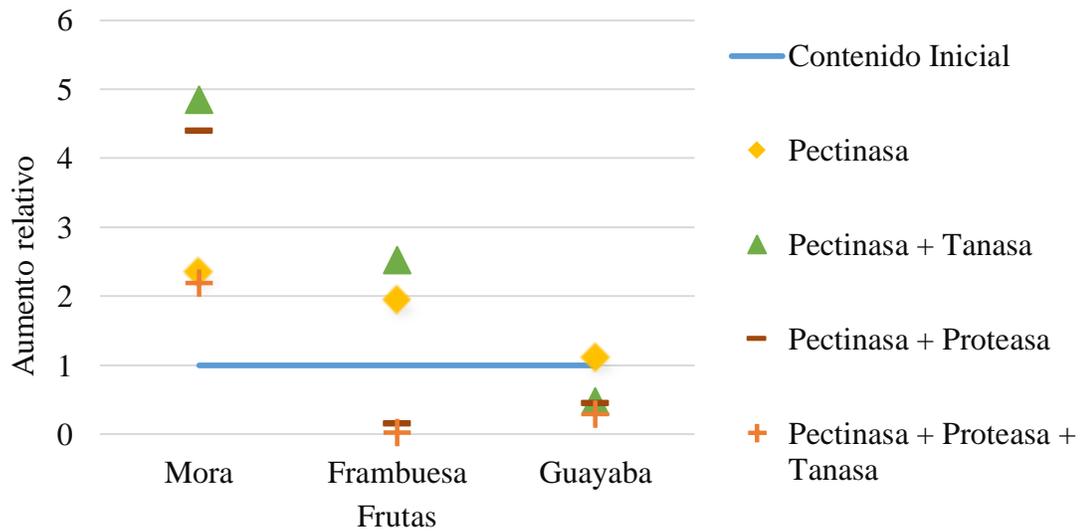
Yousefnezhad B, Mirsaeedghazi H, Arabhosseini A. 2017. Pretreatment of Pomegranate and Red Beet Juices by Centrifugation Before Membrane Clarification: A Comparative Study. *Journal of Food Processing and Preservation*; [citado 2017 abr 12]. 41(2):e12765. doi:10.1111/jfpp.12765.

7. ANEXOS

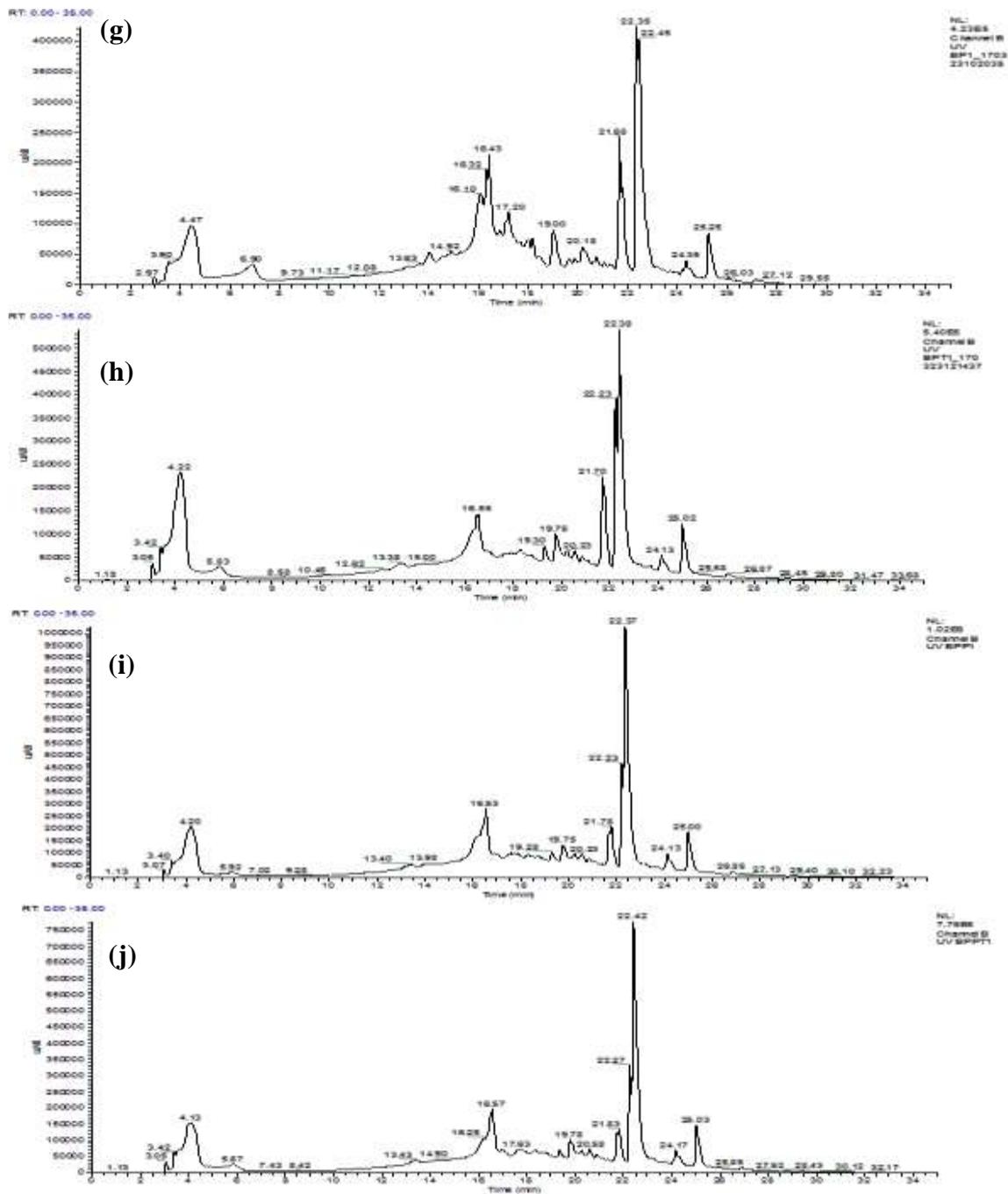
Anexo 1. Aumento relativo de contenido de ácido elágico (mg/L) en cada fruta.



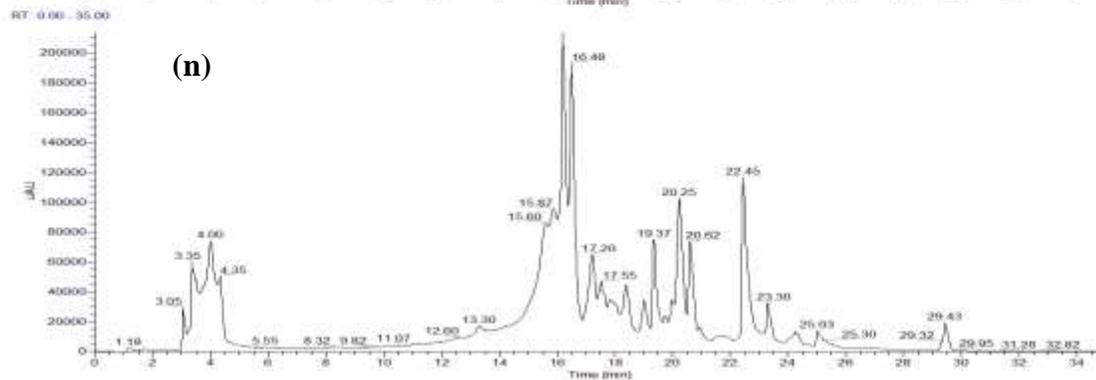
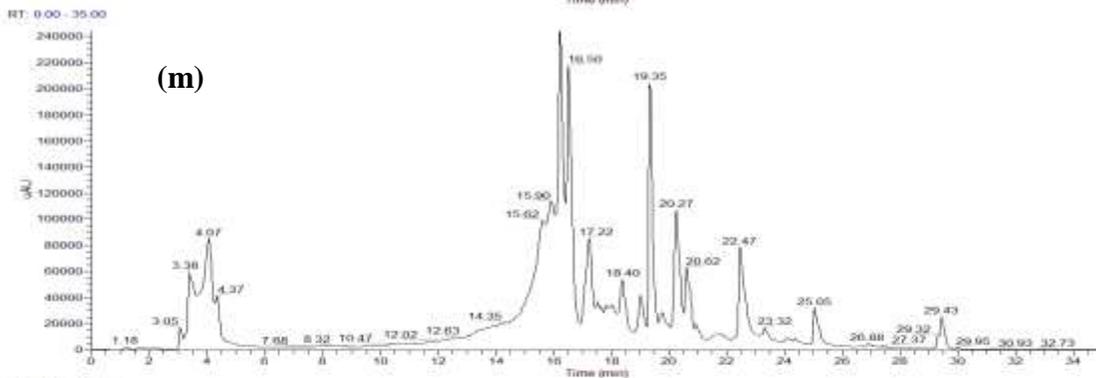
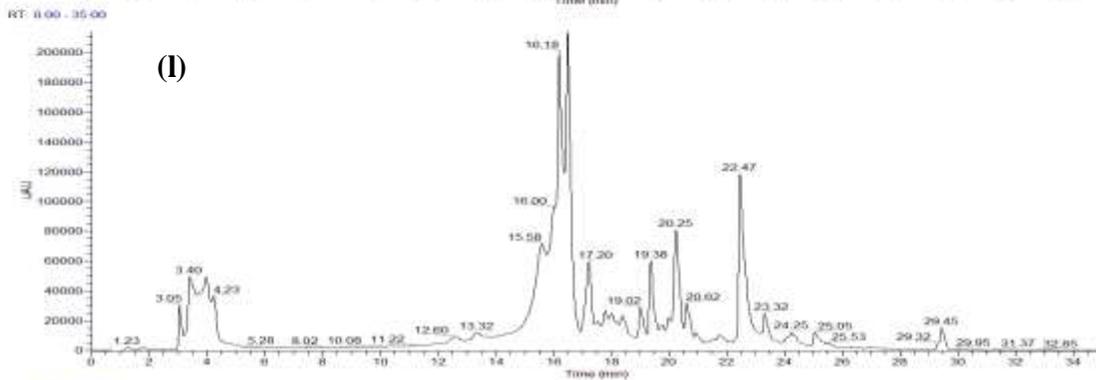
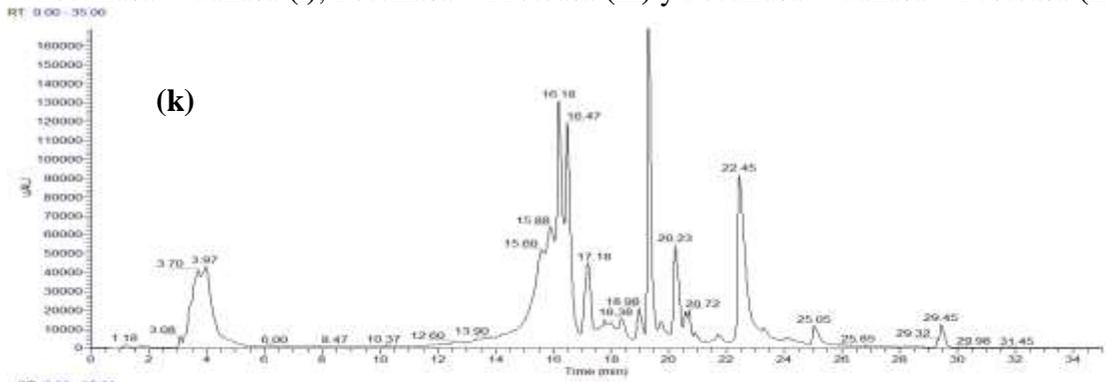
Anexo 2. Aumento relativo de contenido de ácido elágico (mg/L) por combinación de enzimas en cada puré de fruta.



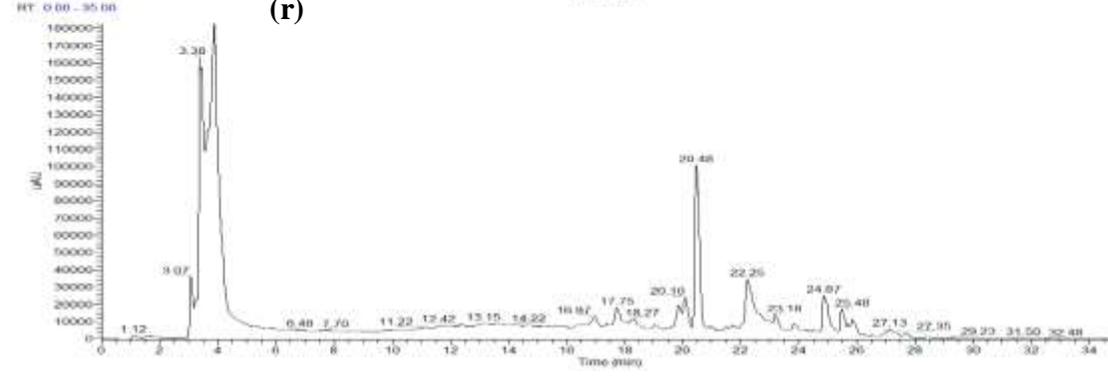
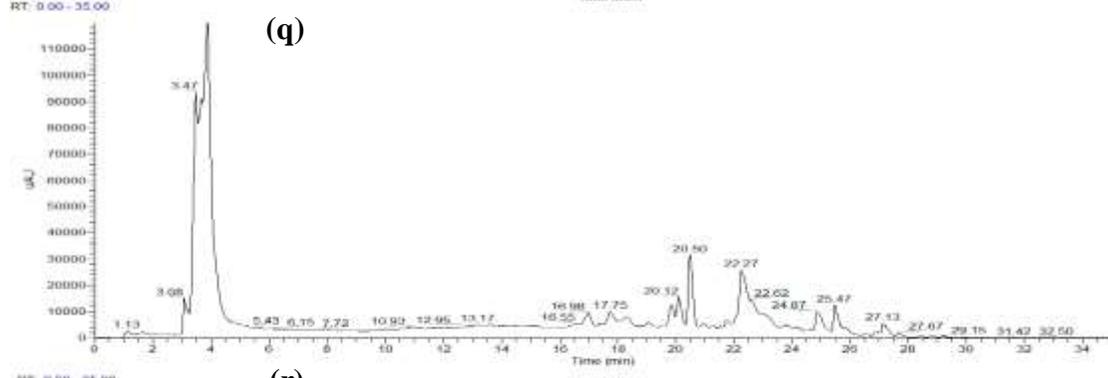
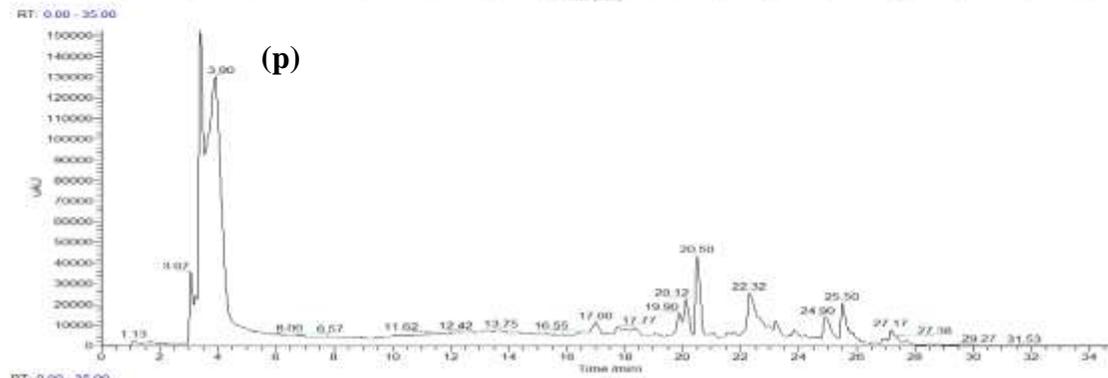
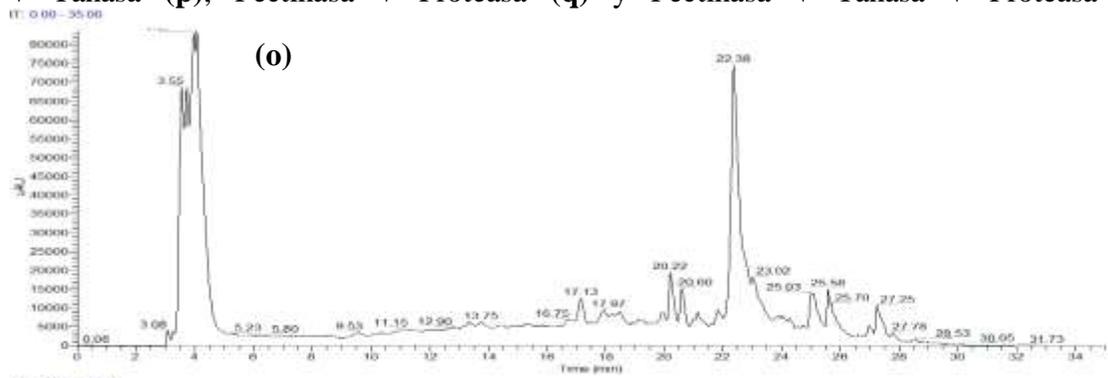
Anexo 3. Cromatogramas de acción enzimática en puré de mora: Pectinasa (g), Pectinasa + Tanasa (h), Pectinasa + Proteasa (i) y Pectinasa + Tanasa + Proteasa (j).



Anexo 4. Cromatogramas de acción enzimática en puré de frambuesa: Pectinasa (**k**), Pectinasa + Tanasa (**l**), Pectinasa + Proteasa (**m**) y Pectinasa + Tanasa + Proteasa (**n**).



Anexo 5. Cromatogramas de acción enzimática en puré de guayaba: Pectinasa (o), Pectinasa + Tanasa (p), Pectinasa + Proteasa (q) y Pectinasa + Tanasa + Proteasa (r).



Anexo 6. Curvas de calibración de ácido elágico para fase III (Gráfica A) y fase II (Gráfica B).

Gráfico A.

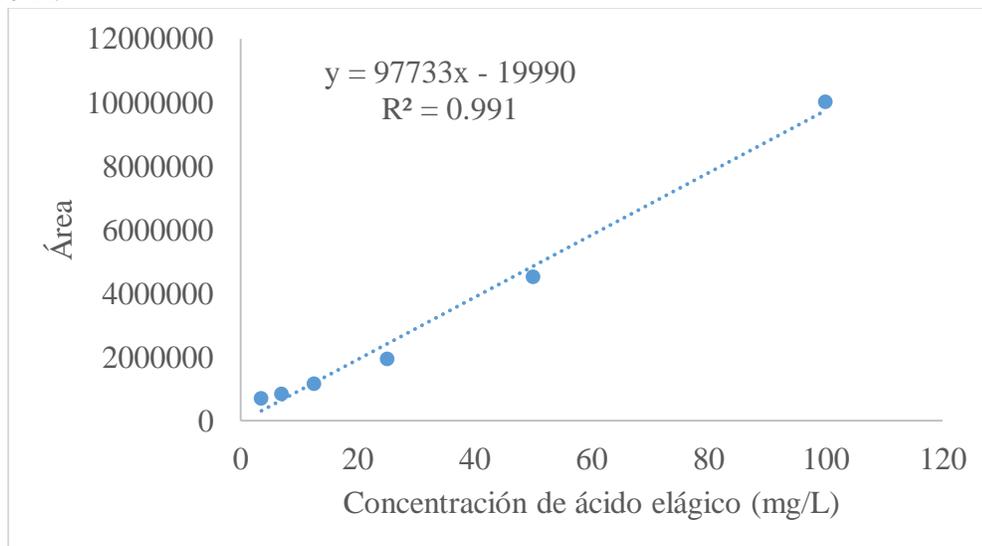
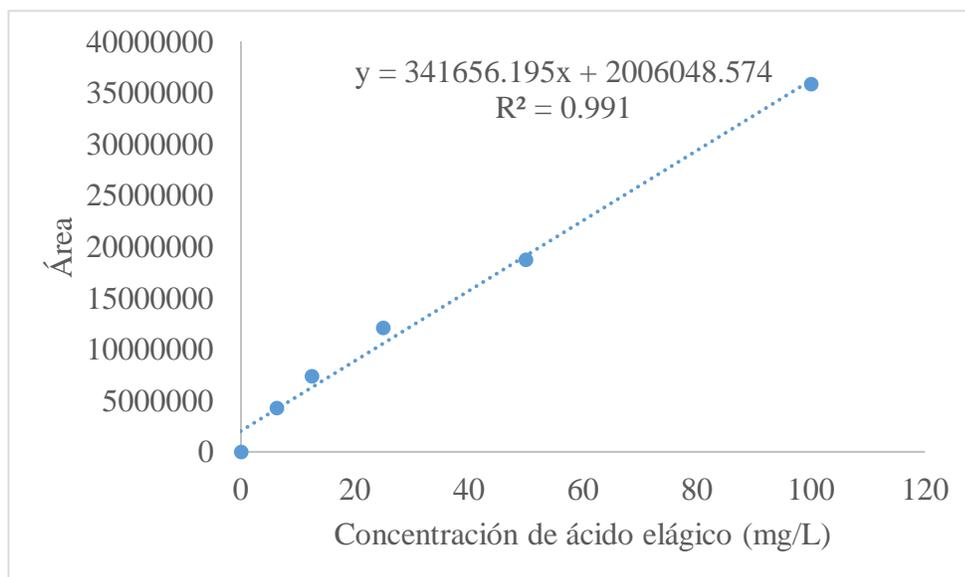


Gráfico B.



Anexo 7. Contenido final de ácido elálgico en cada puré de fruta luego de 24 horas de incubación.

