

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Colegio de Ciencias e Ingeniería

Utilización de quitosano extraído del exoesqueleto de camarón para la clarificación de jugo de manzana *Malus domestica*

**Daniela de los Ángeles Naranjo Bautista
Vanessa Stephany Reyes Ojeda**

**Lucía Ramírez Cárdenas, Ph.D, Directora de Tesis
Javier Garrido, MSc., Codirector de Tesis**

Tesis de grado presentada como requisito
para la obtención del título de Ingeniera en Alimentos

Quito, mayo 2015

**Universidad San Francisco de Quito
Colegio de Ciencias e Ingeniería**

HOJA DE APROBACION DE TESIS

**Utilización de quitosano extraído del exoesqueleto de camarón
para la clarificación de jugo de manzana *Malus domestica***

**Daniela de los Ángeles Naranjo Bautista
Vanessa Stephany Reyes Ojeda**

Lucía Ramírez Cárdenas, Ph.D.,
Directora de Tesis

.....

Javier Garrido, MSc.,
Codirector de Tesis
Coordinador de Ingeniería de Alimentos

.....

Francisco Carvajal, Ph.D.,
Miembro del Comité de Tesis

.....

Ximena Córdova, Ph.D.,
Decana de la Escuela de
Ingeniería

.....

Quito, mayo 2015

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certificamos que hemos leído la Política de Propiedad Intelectual de la Universidad San Francisco de Quito y estamos de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo de investigación quedan sujetos a lo dispuesto en la Política.

Asimismo, autorizamos a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo de investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma:

Nombre: Daniela de los Ángeles Naranjo Bautista

C. I.: 050262726-8

Firma:

Nombre: Vanessa Stephany Reyes Ojeda

C. I.: 172066427-3

Lugar y fecha: Quito, mayo de 2015

DEDICATORIA

A nuestra familia, por el apoyo incondicional y el ejemplo de vida que nos han dado.

A nuestra tutora, por toda la ayuda que nos ha brindado por su guía y su comprensión.

AGRADECIMIENTOS

Al Departamento de Ingeniería de Alimentos de la Universidad San Francisco de Quito, por el uso de sus instalaciones, equipos, materiales y reactivos, además de la colaboración del personal docente y técnico para realizar el presente proyecto de investigación.

RESUMEN

La clarificación de jugos ha sido una práctica muy empleada por la industria alimenticia durante muchos años ya que busca mejorar la apariencia general de los productos. Actualmente, se usan las enzimas como alternativa principal para la clarificación. En este estudio se analizó el uso del quitosano respecto a la utilización del tratamiento enzimático. Se evaluó la reducción de color, turbidez y sólidos solubles totales en muestras tratadas con diferentes concentraciones de quitosano y diferentes tiempos de agitación, al aplicar un diseño completamente al azar (DCA) con arreglo factorial $2 \times 3 + 1$. Se determinó que no existió diferencia significativa ($\alpha=0.05$) en los tratamientos con quitosano para turbidez y sólidos solubles totales, mientras que si hubo diferencia con los tratamientos de quitosano y el control en color. Se escogió los tratamientos con menor concentración y tiempo de agitación para ser evaluados sensorialmente. Considerando las características fisicoquímicas, sensoriales y económicas el mejor tratamiento fue el de menor concentración de quitosano (500 mg/L) y menor tiempo de agitación (3 minutos).

Palabras clave. Quitosano, clarificación, evaluación sensorial, enzimas, jugo de manzana.

ABSTRACT

Juice clarification has been an alternative used by the food industry for many years, aiming to improve the general appearance on the products. Nowadays, the enzymes are used as the principal alternative for clarification. This study analyzed the use of chitosan versus the enzymatic treatment. The color, turbidity and soluble solids reduction was analyzed in samples treated with different concentrations of chitosan and different agitation time, applying a completely randomized design with a $2 \times 3 + 1$ factorial arrangement. It was determined that there was no significant difference in the treatments with chitosan for turbidity and soluble solids, while there was a difference in color for the treatments compare to the witness. According to this, the treatments with the lower concentration and agitation time were chosen for the sensory evaluation. Considering the physicochemical, sensory and economic characteristics the best treatment was the one with the lowest chitosan concentration (500 mg/L) and the lowest agitation time (3 minutes).

Keywords. Chitosan, clarification, sensory evaluation, enzymes, apple juice.

CONTENIDO

Resumen	7
Abstract.....	8
Lista de tablas	10
Introducción.....	11
Materiales y Métodos	13
Materia prima	13
Elaboración de jugo de manzana	13
Clarificación de jugo de manzana	13
Diseño experimental	14
Evaluación sensorial	15
Análisis estadístico	15
Resultados y Discusión.....	16
Conclusiones.....	21
recomendaciones	22
Referencias	23
Anexos.....	26
Anexo 1: Ficha técnica quitosano (Xi'an Realin Biotechnology Co. Ltd.).....	27
Anexo 2: Ficha técnica de pectinasas Pecllyve CP (Lyven).....	28
Anexo 3: Guía de uso de las enzimas pectinasas Pecllyve CP (Lyven)	29

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Tratamientos.....	14
Tabla 2: Resumen del análisis de la varianza (ANOVA) de color, turbidez y sólidos solubles de los tratamientos.....	16
Tabla 3: Color de los tratamientos	17
Tabla 4: Turbidez y sólidos solubles de los tratamientos.....	18
Tabla 5: Sumatoria de ordenamientos de color y turbidez de los tratamientos.....	19

INTRODUCCIÓN

La elaboración de jugos de frutas tiene algunas limitaciones, entre ellas la apariencia turbia. La turbidez y viscosidad de los jugos se debe generalmente a la presencia de pectinas, por tanto se usa enzimas pectinasas que degradan las pectinas, obteniendo un jugo menos turbio (Padrón & Moreno, 2010). En jugo de manzana la suspensión coloidal de ácido málico, pectina, azúcares y tejidos celulares confieren este defecto. Además de las enzimas, otras alternativas que se usan actualmente en la industria alimenticia son variedad de gomas, centrifugación o una combinación entre estas (Castro et al., 2012).

El quitosano es un biopolímero no tóxico y biodegradable derivado de la quitina, que puede ser extraído de los exoesqueletos de crustáceos como el camarón, así como de la pared celular de hongos (Barry et al., 2009; Dias et al., 2013). Para la obtención de este biopolímero se realiza una de-acetilación parcial de la quitina usando hidróxido de sodio (40-50%), que libera los grupos amino y le brinda su potencial catódico (Shahidi et al., 1999). El grado de de-acetilación del quitosano es muy importante ya que al aumentar este incrementa la carga catódica, solubilidad en agua y acción (Dias et al., 2013). La clarificación se realiza por una neutralización de las pectinas, taninos y otros componentes de carácter iónico al contacto con los terminales catódicos del quitosano (Zengxin et al., 2014).

En la industria camaronera, los desechos de exoesqueleto comúnmente conocido como las cáscaras, son desechados. El camarón que es exportado sin su exoesqueleto, es el segundo producto de exportación no petrolera en el país con una participación de 16,5%, después del banano y plátano cuya participación es de 21,8% (Ministerio de Comercio Exterior, 2014; BCE, 2014). Por lo tanto, la cantidad de desechos generados es amplia, ya que solo una pequeña parte se reutiliza para balanceados.

El quitosano tiene diferentes usos en la industria química, farmacéutica, de alimentos, purificación de agua, agricultura, cosméticos, entre otros. Dentro del área de alimentos el

quitosano es útil para la clarificación de jugos, sirve como agente antimicrobiano, para la elaboración de biofilms, estabilizador de color, emulsificación, control enzimático y muchas otras aplicaciones más (Lárez, 2008).

El uso del quitosano en la clarificación de jugos tiene efectos positivos, debido que ayuda con la disminución de acidez, evita el pardeamiento y alarga la vida útil debido a su acción antimicrobiana (Shahidi et al., 1999; Barry et al., 2009).

Este estudio tuvo como objetivo evaluar los efectos del quitosano proveniente de la cáscara de camarón (Xi'an Realin Biotechnology Co. Ltd.) en la clarificación de jugo de manzana *Malus domestica*, determinándose la turbidez, color y sólidos solubles, además de la preferencia sensorial de jueces semi-entrenados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia prima

Se usaron manzanas frescas, maduras y seleccionadas de la variedad Gala, *Malus domestica*, obtenidas del mercado local (Supermaxi) de Cumbayá. El quitosano fue importado de China (Xi'an Realin Biotechnology Co. Ltd.), con un grado de acetilación de 92.62% y una solubilidad en agua de 99.3% (ANEXO 1). La preparación enzimática PECLIVE CP (Pectina-liasa, Poligalactunorasa y Pectina-metil-estearasa) fue obtenida de la empresa Química Comercial Cia. Ltda.

Elaboración de jugo de manzana

Las manzanas fueron lavadas con agua potable, pasadas por una solución de hipoclorito de sodio de 100 mg/L por 1,5 minutos y enjuagadas con agua potable hasta una concentración de cloro residual de 2 a 7 mg/L (FDA, 2001; Al-Zenki & Al-Omariah, 2006). Estas manzanas fueron colocadas en un extractor de jugos (Jack LaLanne's Power Juicer) obteniéndose el jugo.

Clarificación de jugo de manzana

Se adicionó a 200 mL de jugo de manzana diferentes concentraciones de quitosano. Se mezcló a 1200 rpm en una plancha de agitación por 1 min. La concentración de quitosano y el tiempo de agitación de cada tratamiento fue según el diseño experimental. Las muestras decantaron por 2 horas antes de realizar las determinaciones (Castro et al., 2012).

Para el tratamiento control, se siguió el proceso estandarizado del proveedor de enzimas PECLYVE CP (Química comercial Cia. Ltda.) que indica las condiciones de tiempo óptimo de 6 a 8 horas a una temperatura de 15-25 °C para clarificación de jugo de manzana (ANEXO 2 y 3).

Diseño experimental

El estudio se realizó bajo un diseño completamente al azar (DCA) con arreglo factorial $2 \times 3 + 1$, correspondiente a la combinación de dos factores: concentración de quitosano (500 mg/L y 700 mg/L), tiempo de agitación (3, 5, 7 minutos). Además de un tratamiento control (enzimas). Se realizaron tres repeticiones con un total de 21 unidades experimentales (Tabla 1).

Tabla 1: Tratamientos.

Tratamiento	Cantidad de quitosano mg/L	Tiempo de agitación min
1	500	3
2	500	5
3	500	7
4	700	3
5	700	5
6	700	7
7 Control- Enzimas	-	-

Los niveles de concentración de quitosano fueron determinados de acuerdo con Rungsardthong et al. (2006), que observaron una disminución en la turbidez cuando el jugo de manzana fue tratado con quitosano de 0,5 a 0,7 mg/L. Sin embargo, la adición de 1 mg/L de quitosano incrementó la turbidez en jugo de manzana debido a que llegó a un punto de saturación.

Según Castro et al. (2012), el tiempo de agitación tuvo un efecto positivo sobre la viscosidad y la turbidez del jugo. Kamyabi (2011), utilizó 3, 5 y 7 minutos de agitación obteniendo cambios notorios en la turbidez del producto.

Análisis de variables

Se analizó el color y turbidez de acuerdo a De Oliveira et al. (2012), utilizando un espectrofotómetro (Thermo Spectronic modelo Genesys 10 UV), con lecturas de

absorbancia de 420 nm y 670 nm respectivamente. Ambas variables fueron expresadas como el porcentaje removido, calculándose con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ removido} = \frac{(\text{Propiedad antes} - \text{Propiedad después})}{\text{Propiedad antes}} \times 100$$

Los sólidos solubles totales o °Brix se midieron en un refractómetro (Fisher Scientific modelo 334620) según el método AOAC 938.17 para jugos de frutas (Latimer, 2012; ISO, 2013). Se esperaban resultados similares o mejores que el control (enzimas).

Evaluación sensorial

La evaluación sensorial tuvo lugar en el aula de evaluación sensorial de la Universidad San Francisco de Quito con 42 jueces semi-entrenados, 26 mujeres y 16 hombres con edades entre 20 a 25 años. Se realizó una prueba de ordenamiento por preferencia (Bleibaum et al., 2012), evaluándose color, turbidez y sabor. Se presentaron 40 mL de jugo de manzana a 17°C servidos en vasos transparentes de polietileno tereftalato (PET) (Stone et al., 2012).

Análisis estadístico

Los datos fueron interpretados mediante el análisis de varianza (ANOVA) y las medias de color se analizaron con una prueba de separación de medias de Tukey ($\alpha=0.05$). En la evaluación sensorial se utilizó el test de Friedman con un $\alpha=0.05$. Para todos los análisis estadísticos se utilizó el programa Infostat versión 2015 (Morten et al., 2006; DiRenzo et al., 2015).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Tabla 2 muestra que no hubo diferencia significativa entre los tratamientos en relación a la turbidez y sólidos solubles. Además ni los factores ni su interacción interfirieron en el color, turbidez y sólidos solubles de los tratamientos. Solo hubo diferencia significativa en el color entre los tratamientos y entre los tratamientos y el control.

El quitosano actuó sobre los sólidos presentes en el jugo mediante la neutralización de las pectinas, taninos y otros componentes de carácter iónico al contacto con los terminales catódicos del quitosano (Zengxin et al., 2014). Mientras que las enzimas al ser pectinasas, solo trabajan sobre las pectinas. Las enzimas pectinasas usadas rompen las moléculas de pectina, reduciendo su capacidad de retención de agua y facilitando la formación de aglomerados de pectina-proteína (Nur' Aliaa et al., 2010; Dias et al., 2013). Específicamente cada enzima de la preparación actúa de la siguiente manera: la pectina-liasa se une al azar a los pectatos y por un mecanismo de β -eliminación destruye un enlace saturado; la poligalactunorasa, invierte la configuración anomérica de las pectinas y la pectina-metil-esterasa, hidroliza el enlace éster de las unidades metiladas de la pectina (Gummadi et al., 2007). Para que haya una mayor reducción del color, se debió utilizar también amilasas que actúan sobre los almidones del jugo (Hohn et al., 2005).

Tabla 2: Resumen del análisis de la varianza (ANOVA) de color, turbidez y sólidos solubles de los tratamientos.

Fuentes de Variación	GL	Cuadrados Medios		
		Color (% removido)	Turbidez (% removido)	Sólidos Solubles (% removido)
Tratamientos	6	5.93E-04*	1.76E-03 ^{n.s.}	3.39E-06 ^{n.s.}
Concentración de quitosano (A)	1	1.81E-04 ^{n.s.}	3.05E-03 ^{n.s.}	4.02E-06 ^{n.s.}
Tiempo (B)	2	7.92E-05 ^{n.s.}	1.95E-03 ^{n.s.}	4.02E-06 ^{n.s.}
Interacción AxB	2	1.36E-04 ^{n.s.}	1.78E-03 ^{n.s.}	4.02E-06 ^{n.s.}
Tratamientos vs Control	1	2.94E-03*	6.85E-05 ^{n.s.}	2.59E-07 ^{n.s.}
Error	14	7.22E-05	1.25E-04	2.92E-06

n.s. no significativo al 5% de probabilidad por la prueba F.

*significativo al 5% de probabilidad por la prueba F.

Todos los tratamientos con quitosano fueron diferentes del control e iguales estadísticamente entre sí (Tabla 3). Todas las muestras tratadas con quitosano tuvieron una reducción del color superior al 92,95%, siendo similares a los reportado por Castro et al. (2012), debiéndose a la naturaleza poli-catódica del quitosano que se une a los fenoles del jugo de manzana (Oszmianski & Woidyto, 2007). El pardeamiento enzimático del jugo afecta al color. El quitosano controla el pardeamiento debido a que coagula los sólidos a los que las enzimas promotoras del pardeamiento se unen y tiene una capacidad antioxidante (Barry et al., 2009; Fernandez-Saiz & Lagaron, 2011). Por consiguiente, los tratamientos con quitosano tuvieron menos color que el tratamiento con enzimas, resultado no favorable considerando que se esperaba que haya una reducción de color igual a la del control (enzimas).

Tabla 3: Color de los tratamientos

Tratamiento	Color * (%removido)
5	94.78 ± 0.55 a
4	94.32 ± 0.76 a
3	93.92 ± 0.42 a
2	93.81 ± 0.30 a
6	93.48 ± 1.77 a
1	92.95 ± 0.87 a
7	90.49 ± 0.04 b

*Medias ± SD

*Medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha=0.05$) por el test de Tukey.

En la Tabla 4 se muestra la turbidez y sólidos solubles de los tratamientos. La turbidez es principalmente causada por los polisacáridos presentes en el jugo (Barry et al., 2009). Los tratamientos con quitosano tuvieron una reducción de la turbidez entre 92,59 y 98,86%, que concuerda con Castro et al. (2012). Además se notó una acción inmediata del quitosano sobre

la turbidez, que según Chatterjee et al. (2004) se debe a que durante la primera hora ocurre una reducción acelerada de la turbidez, y de ahí en adelante decrece y se equilibra. Ghorbel-Bellaaj et al. (2012) demostró que el quitosano previene una segunda sedimentación en el jugo de frutas.

A su vez el precipitado fue más compacto y la filtración fue más rápida, ya que el quitosano forma grandes aglomerados al combinar sus terminales catiónicos con la pectina de carga negativa y adsorber las sustancias orgánicas disueltas (Renault, 2008).

Tabla 4: Turbidez y sólidos solubles de los tratamientos

Tratamiento	Turbidez * (%removido)	Sólidos Solubles* (%removido)
1	92.59 ± 0.12	3.08 ± 0.00
2	98.52 ± 0.42	3.08 ± 0.00
3	98.79 ± 0.40	3.08 ± 0.00
4	99.12 ± 0.31	2.79 ± 0.45
5	99.73 ± 0.23	3.08 ± 0.00
6	98.86 ± 0.23	3.08 ± 0.00
7	98.45 ± 0.12	3.06 ± 0.03

* Medias ± SD de tres repeticiones.

Los sólidos solubles iniciales del jugo de manzana antes de ser clarificado fueron 13 °Brix, y después de la acción del quitosano se redujeron a un rango entre 12,6 y 12,9. Esta reducción en el jugo puede ocurrir cuando algunos sólidos solubles (pectinas, taninos y otros componentes de carácter iónico) flocculan y luego son removidos en el proceso de filtración (Castro et al., 2012). No ocurrió una alta reducción de °Brix, el quitosano no tuvo acción sobre los azúcares en el jugo, que fue similar a lo obtenido por Chatterjee et al. (2004) y Ghorbel-Bellaaj et al. (2012). El efecto del quitosano y de las enzimas fue el esperado para un agente clarificante que no debe afectar a los glucósidos (De Oliveira, 2012).

Todos los tratamientos con quitosano tuvieron el mismo comportamiento en todas las variables analizadas. Considerando la opción más económica los tratamientos con menor

concentración de quitosano y menor tiempo de agitación fueron los seleccionados para pasar a la evaluación sensorial (Tratamientos 1 y 2).

Evaluación Sensorial

En la Tabla 5 se observa que estadísticamente no hubo diferencia significativa entre los tratamientos con quitosano respecto al color y turbidez, pero si fueron estadísticamente diferentes al control con mayor preferencia. El uso de quitosano para la clarificación de jugos afectó a la preferencia de los jueces de manera positiva, demostrando la factibilidad del uso de este biopolímero para la clarificación de jugos. Chatterjee et al. (2004) encontraron que los jueces no detectaron diferencia significativa en el color, con una mejora en la apariencia. A pesar que el jugo tratado con enzimas tenía mayor color (menor % de reducción), esto no afectó la preferencia de los consumidores.

Tabla 5: Sumatoria de ordenamientos de color, turbidez y sabor de los tratamientos

Tratamiento	\sum <i>Color</i>	\sum <i>Turbidez</i>	\sum <i>Sabor</i>
2	75.00 a	66.00 a	73.00 a
1	76.50 a	69.00 a	87.50 ab
Control – Enzimas	100.50 b	117.00 b	91.50 b
Diferencia mínima significativa entre la suma de rangos	17.29	13.36	17.84

*Rangos con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha=0.05$) por el test de Friedman

La Tabla 5 también muestra que no hubo diferencia entre el tratamiento 1 (Tabla 1) y el tratado con enzimas respecto al sabor, siendo favorable ya que se esperaba un producto con características similares al control. Estudios indican que el quitosano no altera el sabor de los productos, como en revestimientos y jugos (Fai et al., 2008; Dias et al., 2013). Chatterjee et al. (2004) encontraron que las muestras con quitosano mejoraban el sabor lo cual concuerda con el presente estudio ya que el tratamiento 2 tuvo mayor preferencia ($\alpha=0.05$) que el tratamiento control.

Desde el punto de vista económico las enzimas son la mejor alternativa para la clarificación de jugos de frutas. El costo de clarificar 100 L de jugo con pectinasas es de \$ 0,07, mientras que con quitosano es \$ 3,40. Se requerirían 2 g de pectinas y 50 g de quitosano para este volumen de producción. Sin embargo, los costos de producción con quitosano se podrían reducir si el análisis fuese hecho en base a un producto local, en lugar de un producto importado.

CONCLUSIONES

Se logró una clarificación estadísticamente similar al tratamiento control (clarificación enzimática) en turbidez y sólidos solubles totales. Sólo en el color hubo diferencia significativa entre los tratamientos con quitosano y el control. Las muestras tratadas con quitosano tuvieron una reducción del color similar a la obtenida en investigaciones pero superior al tratamiento con enzimas, lo que fue negativo considerando que se esperaba un comportamiento similar.

Sin embargo, al evaluar sensorialmente los tratamientos con menos concentración de quitosano y menor tiempo de agitación (Tratamiento 1 y 2) y el control (enzimas) los jueces semi-entrenados tuvieron mayor preferencia ($\alpha=0.05$) por los dos tratamientos con quitosano en color y turbidez; y por el tratamiento 2 en relación al sabor, teniendo el tratamiento 1 y el tratamiento 2 igual preferencia ($\alpha=0.05$).

Considerando las características fisicoquímicas, sensoriales y económicas el mejor tratamiento fue el de menor concentración de quitosano (500 mg/L) y menor tiempo de agitación (3 minutos).

RECOMENDACIONES

El estudio se podría extender utilizando amilasas en conjunto con las pectinasas al igual que el uso de enzimas en la fruta previo a la obtención del jugo para analizar si el quitosano sigue siendo la mejor alternativa para la clarificación de jugos.

Para realizar una comparación económica más real, se debería analizar la factibilidad de producir el quitosano en el país en lugar de importarlo, considerando la cantidad de desperdicio que produce el sector camaronero al no utilizar la cáscara del camarón.

REFERENCIAS

- Al-Zenki, S., & Al-Omariah, H. (2006). Fruit: Sanitation and Safety. En Y. Hui (Ed.), *Handbook of fruits and fruit processing* (págs. 245-264). Ames: Blackwell. Recuperado el 8 de mayo de 2015, de Organización Mundial de la Salud.
- Barry-Ryan, C., Martin-Diana, A., Rico, D., & Barat, J. (01 de 07 de 2009). Orange juices enriched with chitosan: optimisation for extending the shelf-life. *Dublin Institute of Technology*.
- BCE. (2014). *Exportaciones por producto principal*. Recuperado el 04 de Octubre de 2104, de <http://contenido.bce.fin.ec/home1/estadisticas/bolmensual/ElMensual.jsp>
- Bleibaum, R., Stone, H., Tan, T., Labreche, S., Saint-Martin, E., & Isz, S. (2002). Comparison of sensory and consumer results with electronic nose and tongue sensors for apple juice. *Food Quality and Preference*, 13, 409-422.
- Castro, R., Faria, S., Silva, R., Cardoso, V., & Miranda, M. (2012). Clarification of passion fruit juice with chitosan: Effects of coagulation process variables and comparison with centrifugation and enzymatic treatments. *Process Biochemistry*, 47, 467-471.
- Chatterjee, S. C. (2004). Clarification of fruit juice with chitosan. *Process Biochemistry*(39), 2229-2232.
- De Oliveira, S. M. (2012). Chitosan as flocculant agent for clarification of stevia extract. *Polímeros*, 22 (4).
- Di Renzo, J., Casanoves, F., Balzarini, M., Gonzalez, L., & Tablada, M. (2015). Infostat versión 2015. Córdoba, Argentina: Universidad Nacional de Córdoba.
- Dias, K., Pereira da Silva, D., Alves, L., Ribeiro, R., da Luz, J., Lopes, A., & Newton, G. (2013). Chitin and chitosan: characteristics, uses and production current perspectives. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*, 4(3), 184-191.
- Fai, A., Stamford, T., & Stamford, T. (2008). Potencial biotecnológico de quitosana em sistemas de conservação de alimentos. *Revista iberoamericana de polímeros*, 9(5), 433-451.
- FDA. (2001). *Methods to Reduce/Eliminate Pathogens from Fresh-Cut Produce In: Analysis and Evaluation of Preventive Control Measures for the Control and Reduction/Elimination of Microbial Hazards on Fresh and Fresh-Cut Produce*. Recuperado el 1 de mayo de 2015, de FDA: <http://www.cfsan.fda.gov/~comm/ift3-5.html>.
- Fernández-Saiz, P., & Lagaron, J. (2011). Chitosan for film and coating application. En D. Plackett (Ed.), *Byopolimer: new materials for sustainable films and coatings* (págs. 32-45). Wets Sussex, UK: John Wiley & Sons.

- Ghorbel-Bellaaj, O., Jridi, M., Khaled, H., Jellouli, K., & Nasri, M. (2012). Bioconversion of shrimp shell waste for the production of antioxidant and chitosan used as fruit clarifier. *International Journal of Food Science & Technology*, *47*, 1835-1841.
- Gummadi, S., Manoj, N., & Kumar, S. (2007). Structural and biochemical properties of pectinases. En J. Polaina, & A. MacCabe (Edits.), *Industrial Enzymes: Structure, fuction, applications* (págs. 98-116). AA Dordrecht: Springer.
- Hohn, A., Sun, D., & Nolle, F. (2005). *Processing Fruits: Science and technology* (2ª Edición ed.). Florida: CRC Press.
- ISO. (2003). *ISO 2173:2003 Fruit and vegetable products -- Determination of soluble solids -- Refractometric method*. Recuperado el 12 de noviembre de 2014, de http://www.iso.org/iso/home/store/catalogue_ics/catalogue_detail_ics.htm?csnumber=35851
- Judosn, C. (1980). *Procesos de separación*. Barcelona: Reverte.
- Kamyabi, N. (2011). Reconsideration of Whey Clarification Using Chitosan and Decalciumphosphation Using Thermal Treatment. *World Applied Sciences*, *14*, 101-105.
- Lárez, C. (2008). Algunas potencialidades de la quitina y el quitosano para usos relacionados con la agricultura en Latinoamérica. *UDO Agrícola*(8), 1-22.
- Latimer, G. (2012). *Official Methods of Analisis AOAC International*. Maryland: Association of Official Agricultural Chemists.
- Ministerio de Comercio Exterior. (Enero/Febrero de 2014). *Boletín de Comercio Exterior*. Recuperado el 12 de Noviembre de 2014, de PRO ECUADOR: <http://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/2014/01/FEBLow-1.pdf>
- Morten, C., Meilgraad, B., Carr, T., & Vance, G. (2006). *Sensory Evaluation Techniques, Fourth Edition*. Boca Ratón: CRC Press.
- Nur' Aliaa, A., Siti Mazlina, M., Taip, F., & Liew Abdullah, A. (2010). Response surface optimization for clarification of white pitaya juice using a commercial enzyme. *Jornal of Food Process Engineering*, *33*(2), 333-347.
- Oszmianski, J., & Woidyto, A. (2007). Effects of various clarification treatments on phenolic compounds and color of apple juice. *European Food Research and Technology*, *224*(6), 755-762.
- Padrón, C., & Moreno, M. (mayo de 2010). Evaluación del uso de enzimas y filtración por gravedad para la clarificación de una mezcla diluida de pulpa de frutos de cactus, jugos de naranje y toronja. *SciELO: Revista Facultad Nacional de Agronomía de Medellín*, *63*(1), 5429-5439.
- Renault, F. S. (2008). Chitosan for coagulation/flocculation processes- An eco friendly approach. *European Polymer Journal*, *45*(5), 1337-1348.

- Rungsardthong, V., Wongvuttanakul, N., Kongpien, N., & Chotiwaranon, P. (2006). Application of fungal chitosan for clarification of apple juice. *Process Biochemistry*(41), 589-593.
- Shahidi, F., Vidana, J., & Jeon, Y.-J. (1999). Food applications of chitin and chitosans. *Food Science & Technology*(10), 37-51.
- Stone, H., Bleibaum, R., & Thomas, H. (2012). *Sensory Evaluation Practies* (4^a edición ed.). San Diego: Elsevier.
- Zengxin, L., Xhou, X., Tian, Z., Hong, L., & Wang, S. (2014). Application of modified chitosan in fruit juice clarification. *Applied mechanics and materials*, 651-653, 211-214.

ANEXOS

Anexo 1: Ficha técnica quitosano (Xi'an Realin Biotechnology Co. Ltd.)



地址:西安市高新路 80 号望庭国际 17 层 邮编(P.C):710065
 Add: No 80 Gaoxin road. Xi'an China. Tel :+86-029-88765286 Fax:029-88765269

Certificate of Analysis

Product Name:	Water-Soluble Chitosan	Manufacture Date:	Nov. 21 ,2014
Batch Number:	SPKJT141121	Analysis Date:	Nov. 22,2014
Batch Quantity:	1550.8 kg	Expiration Date	Nov. 20 ,2016

Test	Specifications	Result
Characteristics	Straw Yellow Powder	Complies
Appearance of the Solution	Colorless Transparent	Colorless Transparent
Deacetylation degree	Not less than 85%	92.62%
Residue on Ignition	≤1.0%	0.7%
pH	3~6	4.5
Odor & taste:	Characteristic	Complies
Viscosity CPS	20-200MPA.S	82 MPA.S
Solubility	Over 98% in Water	Over 99.3% in Water
Loss on drying %:	≤10.0%	6.8%
Ash:	≤1.5%	0.78%
Heavy metals PPM:	<10ppm	Complies
Microbiology: Total Plate Count: Yeast & Mold: E.Coli: S. Aureus: Salmonella:	<1000cfu/g <100cfu/g Negative Negative Negative	137cfu/g 36cfu/g Complies Complies Complies
Conclusion:	Conform with specification	

Packing description:	Sealed export grade drum & double of sealed plastic bag
Storage:	Store in cool & dry place not freeze., keep away from strong light and heat
Shelf life:	2 years when properly stored

质量主管: 李志刚
 Quality Assurance Officer: Zhigang Li

检验员: 陈萍
 Analyst: Ping Chen

西安瑞林生物科技有限公司 Tel.: 0086-29-88765286
 地址:陕西省西安市高新路 80 号望庭国际 3 号楼 17 层

Fax: 029-88765269, Web: www.xarealin.com
 Email: sales@xarealin.com

Anexo 2: Ficha técnica de pectinasas Pecllyve CP (Lyven)

**FICHE DE SPECIFICATIONS
SPECIFICATIONS DATA SHEET**

PECLYVE CP
Produit / Product :

Préparation enzymatique de pectinases d'*Aspergillus niger* / enzyme preparation of *Aspergillus niger* pectinases (EC 4.2.2.10, EC 3.2.1.15, EC 3.1.1.11)

Aspect / Appearance :

Liquide brun / brown liquid

Autres composants / Others components :

Glycérol (30%), sulfate d'ammonium (5%), sorbate de potassium (0,14%), benzoate de sodium (0,3%) / Glycerol (30%), ammonium sulphate (5%), potassium sorbate (0,14%), sodium benzoate (0,3%)

Activité enzymatique / Enzymatic activity :

- | | |
|--|-------------|
| ▪ Pectine lyase / Pectin-lyase (PL) | ≥ 110 U/g |
| ▪ Polygalacturonase / Polygalacturonase (PG) | ≥ 2 200 U/g |
| ▪ Pectine méthylestérase / Pectin-methyl-esterase (PE) | ≥ 550 U/g |

Pureté chimique / Chemical purity :

- | | |
|---------------------|--------------|
| ▪ Cadmium / Cadmium | < 0.5 mg /kg |
| ▪ Mercure / Mercury | < 0.5 mg /kg |
| ▪ Arsenic / Arsenic | < 1 mg /kg |
| ▪ Plomb / Lead | < 5 mg /kg |

Pureté biologique / Biological purity :

- | | |
|--|--|
| ▪ Micro-organismes aérobies mésophiles revivifiabiles / Total viable count | < 50 000 cfu/g |
| ▪ Salmonelles / <i>Salmonella sp.</i> | absence dans 25g / negative in 25g |
| ▪ Coliformes / Coliforms | < 30 cfu/g |
| ▪ Anaérobies sulfite-réducteurs / anaerobic sulfate reducers | < 30 cfu/g |
| ▪ <i>Staphylococcus aureus</i> | absence dans 1g / negative in 1g |
| ▪ Activité antibactérienne / Antibacterial activity | aucune / negative |
| ▪ Mycotoxines / Mycotoxins | absence de quantité décelable / negative by test |

* La couleur peut varier d'un lot à l'autre. L'intensité de la couleur n'est pas une indication de l'activité enzymatique.
* Colour can vary from batch to batch. Colour intensity is not an indication of enzyme activity.

LYVEN - Zac Normandial - 11 avenue du pays de Caen - 14 460 COLOMBELLES - France
Tel : 33 (0) 2.31.35.05.30 - Fax : 33 (0) 2.31.34.54.49 - Email : lyven@soufflet-group.com

Anexo 3: Guía de uso de las enzimas pectinasas Pecllyve CP (Lyven)

PECLYVE CP



Pectinolytic enzymes for the clarification of apple juice

PECTIN

The pectic substances (named also pectins) occur in all land plants and are found in the matrix of cell walls and the intercellular space between them. Their composition and structure vary with the fruit concerned. The maturity of the fruit and the duration and conditions of storage before processing can also cause differences.

The pectic substances are hetero-polysaccharides composed of linear chains of galacturonic acids formed by alpha 1-4 links to which non – ionic carbohydrates (arabans, galactans etc.) are joined. The carboxyl groups of the galacturonic acids are esterified with methyl groups, esterification degree depending on the fruit variety.

Pectins can form gels and give rise to flocculation and turbidity causing serious problems in processing and filtration.

THE PECTOLYTIC ENZYMES

The use of enzymes to degrade the pectic substances and to facilitate processing depends on the joint action of several specific activities :

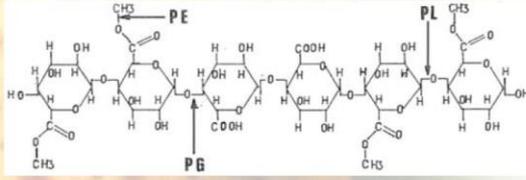
Pectinases (Schema 1)

- Pectin Lyase (PL)
- Endo-Polygalacturanase (PG)
- Pectin Methyl Esterase (PE)

Side activities

- Arabanase
- Xylanase...

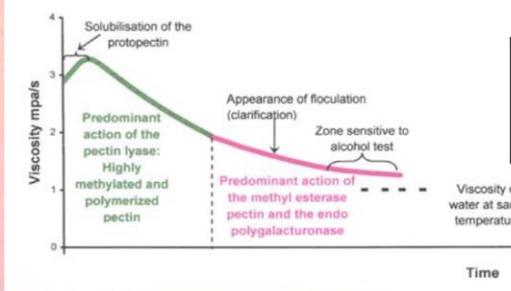
LYVEN has succeeded in developing with its process of SOLID STADE FERMENTATION a product range with different proportions of the three pectinases (PL, PG, PE) and side activities (arabanase, xylanase...)



Schema 1 :
Enzyme Activity with pectin

PECLYVE CP ADAPTED TO THE CLARIFICATION OF APPLE JUICE

PECLYVE CP properties
PECLYVE CP is formulated for a good clarification of apple juice.
 Depending on the kind of pectinases, depectinisation is made in several stages.



Schema 2 :
Evolution of the viscosity of apple juice undergoing depectinisation

PECLYVE CP with its high activities in PL, PG, PE and side activities degrades the pectin content in the juice and therefore allows a good viscosity reduction.

The multiple arabanase activities of **PECLYVE CP** are sufficient to eliminate the risk of araban problems often associated with juice obtained by classical extraction methods.

PECLYVE CP benefits
 The use of **PECLYVE CP** ensures

- A complete and rapid clarification
- An increase in the yield with both filtration and ultrafiltration
- The concentration process is free of problems with a brilliant and stable concentrated product
- A performed juice concentration

PECLYVE CP IN USE

Usage condition

- **Dosage**

The rate of use of PECLYVE CP varies according to the type of juice. It also depends on the maturity of the fruit, the fruit variety, the method of extraction and the temperature and time of depectinisation.

Typical dose rates are 0.8- 2.0g/hl of juice for clarification or are 2-4g/hl for juices intended to concentration

The alcohol test enables the desired dose to be established with reasonable precision.

In practice, PECLYVE CP should be diluted with 5 to 10 times its volume of juice or water prior to incorporation in the juice to be treated. It is important that an homogeneous dispersion of the enzyme is obtained and the use of a metering pump, static mixer etc. with thorough agitation is recommended

- **Optimal time**

The recommended conditions of enzymatic treatment with PECLYVE CP are :

- 1 to 2 hours treatment at 45-55°C
- 6 to 8 hours treatment at 15-25°C

To allow starch degradation PECLYVE CP can be used with AMYLYVE TC or AMYLYVE TC SUPER.

Factors influencing PECLYVE CP efficiency and dosage

- **Dosage/ duration**

If the enzyme concentration is reduced to one-half, the reaction time to a desired end point is rather more than doubled.

- **Temperature**

The optimum temperature for PECLYVE CP is 55°C. At this temperature the reaction rate is maximised without risk of de-activating the enzymes. At low temperatures, a greater reaction time or an increased dose rate should be used in order to obtain the desired results.

For example, a reaction time established at 50°C is doubled with temperature at 30°C. Between 30°C and 6°C the reaction rate decreases by half for every 7°C fall in temperature while below 6°C depectinisation is very slow.

Temperatures between 25° and 45°C should be avoided due to the risk of microbial contamination.

- **pH**

The optimum activity of PECLYVE CP is obtained at a pH value of about 4.5. At pH 3.0 the activity falls to about 40% of the optimum.

- **Other enzyme treatment influence**

The dosage of PECLYVE CP depends on the efficiency of the enzymatic treatment during maceration stage made with PECLYVE PR or PECLYVE PR Plus

PRACTICAL INFORMATION

GMO Status

PECLYVE CP is obtained from a non GMO strain of *Aspergillus niger*.

KOSHER Status

PECLYVE CP bears the KOSHER Status and KOSHER FOR PASSOVER Status.

Presentation and packaging

PECLYVE CP is supplied in liquid form stabilized with glycerol and packaged in drums of 30 kg, 225 kg and 1000 kg.

PECLYVE CP is also available in powder form on request

Precautions in use

PECLYVE CP is non-flammable, miscible with water in all proportions. In case of contact with the skin or the eyes, rinse thoroughly with water.

Conformity to standards

PECLYVE CP conforms to the relevant French and international standards.

France : Arrêté 19/10/2006

International : Specifications agreed by FAO, WHO, JECFA and FCC specifications.

Storage

When stored between 3 and 10°C, PECLYVE CP shows no significant loss in activity over a period of one year.

LYVEN your partner,

Due to its diverse structure and great flexibility, LYVEN can provide special formulations adapted to your needs. Do not hesitate to contact us.

LYVEN

Technical and Sells Services
ZAC Normandial
11, avenue du Pays de Caen
14460 COLOMBELLES – FRANCE

Tél. : 33 (0) 2 31 35 05 30
Fax : 33 (0) 2 31 34 54 49
Site web : www.lyven.com