

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

**CARACTERIZACION BIOQUIMICA DE FRUTOS DE
PAPAYA (*Carica papaya*, cv. *Sunrise*),
HEMBRA Y HERMAFRODITA,
EN RELACION CON SU APTITUD AL PROCESADO
POR CONGELACION**

TESIS DOCTORAL

MARIA GLORIA LOBO RODRIGO

MADRID 1995

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA

CARACTERIZACION BIOQUIMICA DE FRUTOS DE PAPAYA
(Carica papaya, cv. Sunrise), HEMBRA Y HERMAFRODITA,
EN RELACION CON SU APTITUD AL PROCESADO
POR CONGELACION

MARIA GLORIA LOBO RODRIGO

Madrid, 1995

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

CARACTERIZACION BIOQUIMICA DE FRUTOS DE PAPAYA

(Carica papaya, cv. Sunrise), HEMBRA Y HERMAFRODITA,

EN RELACION CON SU APTITUD AL PROCESADO

POR CONGELACION

MEMORIA

que para optar al grado de

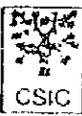
DOCTOR EN FARMACIA

presenta

MARIA GLORIA LOBO RODRIGO

INSTITUTO DEL FRIO
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

Madrid, 1995



**M. PILAR CANO DOLADO, DRA. EN CIENCIAS QUIMICAS,
COLABORADOR CIENTIFICO DEL INSTITUTO DEL FRIO DEL
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS,**

CERTIFICA: que el presente trabajo titulado "Caracterización bioquímica de frutos de papaya (*Carica papaya*, cv. Sunrise) Hembra y Hermafrodita, en relación con su aptitud al procesado por congelación", y que constituye la Memoria que presenta la Licenciada María Gloria Lobo Rodrigo para optar al grado de Doctor, ha sido realizada en el Departamento de Ciencia y Tecnología de Productos Vegetales en el Instituto del Frío del CSIC bajo mi dirección.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo el presente Certificado en Madrid, a dieciocho de Septiembre de mil novecientos noventa y cinco.


M. Pilar Cano Dolado

A mis padres

A mis hermanos

A mis amigos

AGRADECIMIENTOS

La realización de la presente Tesis Doctoral no habría sido posible sin contar con las facilidades proporcionadas por el Instituto del Frío (Consejo Superior de Investigaciones Científicas), y la disponibilidad y apoyo científico prestados por mi directora de Tesis Dra. M^a. Pilar Cano Dolado.

Deseo manifestar mi gratitud a la Dra. Araceli Redondo Cuenca, por la confianza depositada en mí al aceptar la ponencia de este Trabajo de Investigación.

Mi mayor agradecimiento a mis padres por el cariño y apoyo que siempre me han brindado. Deseo hacerles partícipes de esta Memoria pues con su actitud y su afán de superación me han inculcado las directrices a seguir en mi vida universitaria, profesional y personal.

Deseo expresar mi gratitud a la Dra. Begoña de Ancos por su inestimable ayuda en el desarrollo del estudio de los compuestos carotenoides, así como por su preocupación constante en la fase de redacción de l presente Trabajo de Investigación.

Mi más sincero agradecimiento a mi compañera y amiga Almudena Hernández Cimiano con quien he compartido mis mejores y peores momentos durante mi labor investigadora.

Tengo que mostrar mi agradecimiento al Departamento de Ciencia y Tecnología de Productos Vegetales por el apoyo material y humano que me han prestado. Especialmente a la Dra. Carmen Fúster, así como a Mari Carmen Rodríguez y Marianne Monreal, cuya colaboración desinteresada agradezco sinceramente.

Asimismo, agradezco a mis compañeros del "Frío" el "cálido" ambiente reinante durante estos tres años de continuo trabajo.

Mi abuela y abuelos ausentes han sabido crear una familia en la que combinaron la armonía en las relaciones personales y la responsabilidad en el trabajo. Me siento realmente afortunada de pertenecer a una familia tan unida.

Siempre son importantes los momentos de "relajación" que no habrían tenido lugar sin contar con mis hermanos y amigos canarios y peninsulares.

Por último quiero agradecer al Dr. Clive West la concesión de una beca postdoctoral en Wageningen, sin la cual no habría finalizado este trabajo de investigación con tanta premura.

INDICE

INDICE

1. INTRODUCCION.

1.1. ANTECEDENTES HISTORICOS DE LA PAPAYA.	1
1.2. CLASIFICACION SISTEMATICA.	2
1.3. MORFOLOGIA DE LA PLANTA.	3
1.3.1. <u>Propagación y plantación.</u>	9
1.3.2. <u>Factores que influyen en el desarrollo de la planta.</u>	14
1.4. EL FRUTO.	16
1.4.1. <u>Fructificación.</u>	16
1.4.2. <u>Composición del fruto.</u>	17
1.4.2.1. Composición química.	17
1.4.2.2. Composición bioquímica.	20
1.4.3. <u>Recolección y conservación del fruto.</u>	24
1.4.4. <u>Tratamientos post-cosecha.</u>	25
1.4.5. <u>Procesado de los frutos.</u>	26
1.5. CONGELACION DE FRUTAS.	28
1.5.1. <u>Operaciones previas al proceso de congelación.</u>	28
1.5.2. <u>Proceso de congelación.</u>	30
1.5.3. <u>Modificaciones de la calidad durante la conservación en estado</u> <u>congelado.</u>	35
1.5.3.1. Cambios físicos.	35

1.5.3.2. Cambios químicos y bioquímicos.	36
1.5.3.3. Factores tiempo, tolerancia y temperatura (TTT).	38
1.5.3.4. Factores producto, procesado y envasado (PPP).	40
1.5.4. <u>Descongelación</u>	41
2. OBJETIVOS.	44
3. MATERIALES Y METODOS.	46
3.1. MATERIAL VEGETAL.	46
3.2. CONSERVACION EN ESTADO REFRIGERADO.	49
3.3. PROCESADO DE LOS FRUTOS.	50
3.4. CONSERVACION FRIGORIFICA EN ESTADO CONGELADO.	54
3.5. PREPARACION DE LAS MUESTRAS OBJETO DE ANALISIS.	54
3.5.1. <u>Descongelación</u>	54
3.5.2. <u>Obtención y conservación de producto liofilizado</u>	55
3.5.3. <u>Congelación con nitrógeno líquido y almacenamiento a -80°C.</u>	55
3.6. DETERMINACIONES ANALITICAS.	55
3.6.1. <u>Parámetros físicos</u>	56
3.6.1.1. Firmeza.	56
3.6.1.2. Color.	59
3.6.1.3. Exudado.	59
3.6.2. <u>Parámetros físico-químicos</u>	60

3.6.2.1. pH.	60
3.6.2.2. Acidez titulable.	60
3.6.2.3. Sólidos solubles.	60
3.6.2.4. Sólidos totales.	61
3.6.3. <u>Parámetros químicos</u>	61
3.6.3.1. Carotenoides.	61
3.6.3.2. Acidos orgánicos.	66
3.6.3.3. Pectinas totales.	69
3.6.4. <u>Parámetros bioquímicos</u>	71
3.6.4.1. Obtención del extracto enzimático.	72
3.6.4.2. Determinación de actividades enzimáticas.	72
3.6.4.2.1. Actividad Peroxidasa (POD).	72
3.6.4.2.2. Actividad Polifenoloxidasa (PPO).	73
3.6.4.3. Determinación de las proteínas extraídas.	73
3.6.4.4. Análisis electroforético en geles de bisacrilamida.	74
3.6.4.4.1. Preparación de los geles de bisacrilamida.	75
3.6.4.4.2. Preparación de las muestras.	76
3.6.4.4.3. Desarrollo de la electroforesis.	77
3.6.4.4.4. Revelado de geles.	78
3.6.4.4.4.1. Proteínas extraídas.	78
3.6.4.4.4.2. Isoenzimas de POD.	78
3.6.4.4.4.3. Isoenzimas de PPO.	79
3.6.4.4.4.5. Secado de geles.	79

3.7. ANALISIS SENSORIAL.	80
3.7.1. <u>Preparación de las muestras. Tipos.</u>	80
3.7.2. <u>Pruebas sensoriales.</u>	82
3.7.2.1. Aceptabilidad-preferencia.	82
3.7.2.2. Análisis descriptivos.	82
3.8. ANALISIS ESTADISTICO.	85
3.8.1. <u>Análisis descriptivo de la muestra.</u>	85
3.8.2. <u>Análisis de varianza.</u>	85
3.8.3. <u>T-test.</u>	86
3.8.4. <u>Análisis de frecuencia.</u>	86
4. RESULTADOS Y DISCUSION.	89
4.1. PARAMETROS BIOQUIMICOS.	89
<u>PUESTA A PUNTO DE LAS DETERMINACIONES</u>	
<u>ENZIMATICAS.</u>	89
4.1.1.1. Elección del tampón de extracción.	89
4.1.1.2. Elección del pH óptimo de actuación.	93
4.1.1.3. Especificidad de PPO hacia distintos sustratos.	94
4.1.1.4. Elección de la concentración de sustrato en la	
determinación de PPO.	95

4.1.2. <u>PARAMETROS BIOQUIMICOS: EFECTO DE LA</u>	
<u>MADURACION, PROCESO DE CONGELACION Y</u>	
<u>CONSERVACION EN ESTADO CONGELADO</u>	99
4.1.2.1. Proteínas extraídas.	99
4.1.2.1.1. Discusión de los resultados.	103
4.1.2.2. Actividad POD total y específica.	105
4.1.2.2.1. Discusión de los resultados.	112
4.1.2.3. Actividad PPO total y específica.	113
4.1.2.3.1. Discusión de los resultados.	121
4.1.3. <u>CARACTERIZACION DE LAS PROTEINAS</u>	
<u>EXTRAIDAS Y DE LA ACTIVIDAD PEROXIDASA</u>	
<u>(POD) Y POLIFENOLOXIDASA (PPO).</u>	122
4.1.3.1. Puesta a punto de las técnicas electroforéticas para la	
determinación de proteínas extraídas, POD y PPO.	122
4.1.3.1.1. Revelado de las proteínas.	122
4.1.3.1.2. Revelado de la actividad POD.	123
4.1.3.1.3. Revelado de la actividad PPO.	124
4.1.3.2. Evolución de las proteínas extraídas.	125
4.1.3.2.1. Discusión de los resultados.	126
4.1.3.3. Evolución del patrón isoenzimático de la peroxidasa.	127
4.1.3.3.1. Discusión de los resultados.	130
4.1.3.4. Evolución del patrón isoenzimático de polifenoloxidasas.	132
4.1.3.4.1. Discusión de los resultados.	137

4.2. CARACTERISTICAS NUTRICIONALES. COMPUESTOS

RELACIONADOS.	139
4.2.1. <u>SOLIDOS SOLUBLES</u>	139
4.2.1.1. Discusión de los resultados.	143
4.2.2. <u>CONTENIDO EN AGUA Y EXUDADO</u>	144
4.2.2.1. Discusión de los resultados.	148
4.2.3. <u>SOLIDOS TOTALES</u>	149
4.2.3.1. Discusión de los resultados.	152
4.2.4. <u>PECTINAS TOTALES</u>	153
4.2.4.1. Discusión de los resultados.	157
4.2.5. <u>ACIDEZ</u>	159
4.2.5.1. pH.	159
4.2.5.2. Acidez titulable.	161
4.2.5.3. Análisis de los ácidos orgánicos por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (Oxálico, cítrico, galacturónico, málico, quínico, succínico y fumárico).	164
4.2.5.4. Discusión de los resultados.	184
4.2.6. <u>CAROTENOIDES</u>	187
4.2.6.1. Xantofilas.	200
4.2.6.2. Carotenos hidrocarbonados.	205
4.2.6.3. Esteres de xantofilas.	210
4.2.6.4. Discusión de los resultados.	220
4.3. CARACTERISTICAS SENSORIALES.	232

4.3.1. <u>RODAJAS DE PAPAYA</u>	234
4.3.1.1. Textura.	234
4.3.1.1.1. Análisis instrumental de la firmeza.	235
4.3.1.1.1.1. Discusión de los resultados.	239
4.3.1.1.2. Análisis sensorial de la textura.	240
4.3.1.1.2.1. Aceptabilidad de la textura.	241
4.3.1.1.2.2. Análisis descriptivo de la firmeza.	244
4.3.1.1.3. Discusión de los resultados.	246
4.3.1.2. Color.	249
4.3.1.2.1. Análisis instrumental del color.	249
4.3.1.2.2. Análisis sensorial del color.	257
4.3.1.2.2.1. Aceptabilidad del color.	257
4.3.1.2.2.2. Análisis descriptivo del color.	260
4.3.1.2.2.3. Discusión de los resultados.	262
4.3.1.3. Sabor.	266
4.3.1.3.1. Análisis sensorial del sabor.	266
4.3.1.3.1.1. Aceptabilidad del sabor.	266
4.3.1.3.1.2. Análisis descriptivo del sabor.	268
4.3.1.3.1.3. Discusión de los resultados.	271
4.3.2. <u>POSTRES</u>	273
4.3.2.1. Análisis sensorial de la textura.	274
4.3.2.1.1. Aceptabilidad de la textura.	274
4.3.2.1.2. Análisis descriptivo de la firmeza.	276

4.3.2.1.3. Discusión de los resultados.	278
4.3.2.2. Análisis sensorial del color.	280
4.3.2.2.1. Aceptabilidad del color.	280
4.3.2.2.2. Análisis descriptivo del color.	281
4.3.2.2.3. Discusión de los resultados.	284
4.3.2.3. Análisis sensorial del sabor.	285
4.3.2.3.1. Aceptabilidad del sabor.	285
4.3.2.3.2. Análisis descriptivo del sabor.	287
4.3.2.3.3. Discusión de los resultados.	289
5. CONCLUSIONES.	291
6. BIBLIOGRAFIA.	295
7. ANEXO.	306

1. INTRODUCCION

1.1. ANTECEDENTES HISTORICOS DE LA PAPAYA.

La papaya (*Carica papaya*) es una fruta tropical, que tiene su origen en América Central, probablemente al sur de Méjico, de donde se ha extendido por todos los países tropicales, cultivándose desde tiempo inmemorial en toda la zona citada, las Antillas, Brasil, Africa Tropical (Kenya, Tanganica...) y Norteamérica (California, Florida...).

Los españoles y portugueses la introdujeron en Filipinas y Malasia, y de allí a las Islas Hawaii, India y Ceilán, donde se cultiva a gran escala. Asimismo, se desarrolla muy bien en todo el archipiélago canario.

Las innovaciones de técnicas post-cosecha, así como el transporte aéreo han permitido que este fruto, que es muy sensible al tener una piel muy fina, se haya desarrollado para la exportación comercial. El grupo Solo, de frutos más pequeños, proporcionó en Hawaii en 1988 una producción por encima de los 22,4 millones de kg de producto fresco y 4,4 millones de Kg de producto procesado (puré o néctar), en 1093 hectáreas de terreno, que fueron exportados a América del Norte y Japón principalmente (Chan, 1993). En Malasia, en 1988, las plantaciones de papaya, variedad exótica, cubrían alrededor de 3,240 hectáreas (Ahmad, 1989).

En otros países como Filipinas, este fruto puede consumirse verde como hortaliza. Además, las hojas de esta especie frutal pueden secarse y utilizarse para hacer un té herbáceo. En la India, se utiliza el fruto verde para hacer salsas picantes, y cocinado como curry. Otra aplicación es conservarlo enlatado en trozos en almíbar (Chan, 1993).

En España se cultiva en las Islas Canarias, conociéndose desde hace más de 200 años, experimentando en los últimos años una gran expansión que está en relación con la demanda de este fruto en el mercado (Rodríguez y Galán, 1992).

Otros nombres populares de esta fruta son: "papaw" o "pawpaw" en el Reino Unido, "mamao" en Brasil, "lechoso" en Venezuela y "fruta bomba" en Cuba.

1.2. CLASIFICACION SISTEMATICA.

El papayo es una dicotiledónea del orden Parietales, cuyo género *Carica*, al que pertenece la papaya, se incluye actualmente en la familia Caricaceae o Papayaceae, aunque algunos botánicos lo han incluido en la familia de Passifloraceae, la familia de la pasionaria, y está relacionado por su fruto con la familia Cucurbitaceae, que es la familia de la calabaza y el melón. Este género contiene alrededor de 40 especies, pero sólo tres son de importancia hortifrutícola; *C. papaya*, *C. candamarcensis* (papaya de montaña) y *C. monoica* (Ibar, 1986).

Según Storey, (1972) y Samson, (1980), los cultivares que se mantienen en la actualidad son, "Solo" de Hawaii, "Hortus gold" de Africa del Sur, "Improved Petersen" de Australia y "Betty" de Florida. Se han desarrollado muchas líneas del cultivar "Solo" como son "Solo 5", "Solo 8", "Bush" y "Sunrise". Todos ellos son hermafroditas con frutos en forma de pera, un peso alrededor de 0,5 kg, teniendo los dos últimos la pulpa de color rojizo. El cultivar "Hortus Gold" es dioico, su pulpa es de color dorado y su peso en

torno a 1,5-2 kg. En la India, el cultivar "Coorg Honey" es bisexual. En Indonesia "Semanka" tiene frutos grandes de pulpa rojiza. En Australia los cultivares más importantes son: "Guinea Gold" (bisexual), "Sunnybank" y "Hybrid 5" (dioico) (Salunkhe, 1984). Otros autores hablan del grupo "Solo" en el que se enclavan varios cultivares como el "Sunrise", "Higgins" y "Sunrise" (Hamilton e Ito, 1968; Rodríguez y Galán, 1992).

1.3. MORFOLOGIA DE LA PLANTA.

El papayo es una planta herbácea de crecimiento rápido y de vida corta. La duración de su vida es de 7 a 15 años pero desde un punto de vista comercial, debe ser como máximo de tres años, ya que después la recolección se hace dificultosa por la altura que alcanza la planta y porque la producción disminuye, no siendo por tanto rentable su mantenimiento.

De porte singular, puede llegar a 7,5 metros o más de altura y tiene el aspecto de un pequeño árbol de tronco simple, sin ramificar, de consistencia más carnosa que leñosa, con las cicatrices de las hojas desprendidas a lo largo de él y con un penacho o cogollo de hojas perennes de color verde intenso en su ápice. Las hojas, de gran tamaño y provistas de un largo peciolo, son palminervias y están divididas en siete grandes lóbulos en disposición palmada, que a su vez se encuentran divididas en forma pinnada. Las flores son actinomorfas, pentámeras, unisexuales o hermafroditas. El fruto es en baya. Todos los órganos de la planta segregan un latex que contiene papaína, que es un enzima proteolítico (Ibar, 1986).



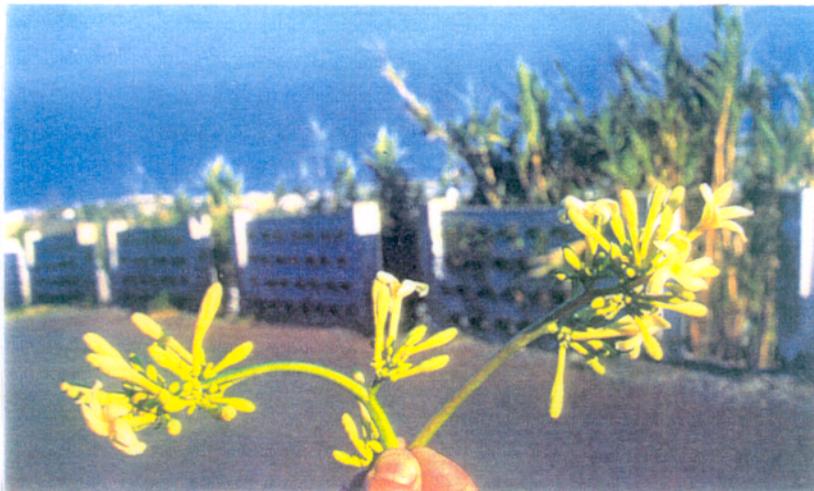
Fotografía Invernadero de papaya (*Carica papaya*, cv. Sunrise) en la localidad de las Galletas (Tenerife, Islas Canarias).

Esta especie frutal tiene un comportamiento floral muy característico y curioso.

La papaya tiene los sexos separados, pues incluso las flores masculinas (♂) y femeninas (♀) están en distinto pie de la planta, por lo que es una planta

dioica; sin embargo, algunas veces las flores masculinas (δ) y femeninas (φ) están en el mismo pie, por lo que la planta es monoica, y si existen flores masculinas (δ), femeninas (φ) y hermafroditas (φ^{δ}), entonces la planta es polígama o trioica, teniendo los frutos formas distintas según el tipo de flor.

La flor masculina es inconfundible, ya que crece en largos pedúnculos, que miden más de medio metro, nacen de la axila de las hojas y en cuyos extremos se encuentran racimos en los que se pueden contar, en cada uno, 15-20 florecillas.



Fotografía 2: Inflorescencia masculina.

Las flores masculinas, son más pequeñas que las femeninas y hermafroditas; el cáliz está formado por una corona o estrella de cinco puntas poco marcadas y situada en la prolongación del pedúnculo; la corola, formada por cinco pétalos soldados (gamopétalas), originan un largo tubo en cuyo interior se encuentran 10 estambres, colocados en dos verticilos. En ocasiones,

estas flores presentan rudimentos de pistilo sin estigma. Normalmente, estos pistilos no se convierten en fruto, pero algunas veces dan lugar a unos frutos alargados de muy mala calidad, situados en los extremos de los pedúnculos.

Las flores femeninas tienen el cáliz formado por una corona o estrella de cinco puntas bien marcadas. La corola está formada por cinco pétalos separados, de forma oval alargada, de color blanco amarillento, que cuando son muy tiernos, su punta tiene color violeta, no están soldados y se desprenden con facilidad. Estas flores, naturalmente, no tienen estambres, a lo más pueden conservar cinco estaminoides, que son restos estériles de los estambres. Los carpelos, en número de cinco, son abiertos y están soldados entre sí, dando lugar a un ovario unilocular de placentación parietal, con cinco estigmas muy divididos en disposición palmeada. Los frutos de este pie son globosos.



Fotografía 3: Flor femenina.

La flores hermafroditas pueden ser de tres tipos:

- * **Pentandrias:** Son parecidas en su aspecto a las flores femeninas, de las que se diferencian únicamente, en que al separar los pétalos se aprecian cinco estambres fértiles y en que en el ovario se observan cinco lóbulos, correspondientes a los cinco pistilos. Los frutos de esta flor son globosos y bien lobulados.
- * **Elongatas:** Son semejantes a las masculinas. Son alargadas, cilíndricas y gamopétalas, tienen diez estambres fértiles y el ovario es cilíndrico y alargado. Los frutos que originan también son alargados.
- * **Intermedias o irregulares:** Su aspecto es intermedio entre la pentandria y la elongata, pero sin estar bien definida, produciendo frutos de tamaño y forma irregular.



Fotografía 4: Flor hermafrodita.

Las flores femeninas en condiciones normales necesitan el polen de las masculinas o hermafroditas para producir frutos, aunque en muchas ocasiones en los trópicos y particularmente en Canarias pueden desarrollarse partenocárpicamente. Los frutos más comerciales son los hermafroditas. Por tanto es deseable que en la plantación, el número de plantas hermafroditas sea mayor que el de femeninas, con lo que conseguimos, por un lado que se polinicen adecuadamente las plantas femeninas y por otro una mayor productividad de frutos hermafroditas, que son los que demanda el mercado. Las plantas masculinas también pueden polinizar las flores femeninas y hermafroditas, pero éstas no producen frutos adecuados para el comercio.

El sexo está determinado por tres factores genéticos: M_1 es dominante para el desarrollo de flores masculinas, el M_2 es dominante para flores hermafroditas y m es recesivo para flores femeninas. Cada óvulo o polen es haploide llevando sólo uno de estos factores (Chandler, 1962).

A efectos prácticos es conveniente conocer qué sexo se obtiene en los distintos cruces posibles, como se muestra en la Tabla I, de los autores Rodríguez y Galán (1992):

TIPO DE CRUCE		SEXO OBTENIDO		
DONANTE DE POLEN	RECEPTOR DE POLEN	♂	♀	♂
♀	♀	--	50%	50%
♂	♂	25%	25%	25%
♂	---	--	50%	25%

Tabla I: Sexo de la planta obtenido a partir de todos los posibles cruces.

El problema reside en que hasta la floración no se sabe de qué sexo va a ser la planta. De ahí que se aconseje sembrar alrededor de 2 ó 3 plantas por hoyo para asegurarse de que, al menos una de ellas va a ser hermafrodita.

Aunque el sexo de las flores viene determinado genéticamente, las condiciones del medio pueden producir variaciones a nivel de expresión de los caracteres sexuales, que se traducen en fenómenos temporales de cambio de sexo en las flores, fenómeno muy frecuente en Canarias cuando las temperaturas están por debajo de 20°C. (Rodríguez, y Galán, 1992).

Las flores hermafroditas tienen la peculiaridad de transformar los estambres en carpelos (carpeloidía) cuando las temperaturas están por debajo de 20°C en el momento de formación de la flor, originando frutos deformes que no pueden ser comercializados. Esto nos conduce a comprender que, en los mejores emplazamientos canarios y sobretodo bajo invernadero, es posible producir con éxito frutos hermafroditas del cultivar "Sunrise", para la exportación. Existen otros cultivares "Higgins" y "Kapoho", que son menos productivos que el "Sunrise".

1.3.1. PROPAGACION Y PLANTACION.

La forma más fácil y económica de propagar el papayo es por medio de semillas, a pesar de las dificultades que se presentan al obtenerse plantas de diferente sexo y que, en ocasiones, no reproducen exactamente las características de la planta originaria. Estos inconvenientes pueden evitarse recurriendo a la multiplicación de la planta por medio de esquejes, estacas o injertos.

Los esquejes se obtienen de las ramificaciones del arbolito, y puesto que éste no se ramifica hasta que es viejo (al cabo de 3-4 años de cultivo), se debe proceder a su obtención artificial. Para ello en los árboles de más de tres años se procede a la operación de desmoche, que consiste en la eliminación de la cabeza o cogollo del árbol, con lo que se le obliga a ramificarse.

Cuando estos brotes tienen una longitud de 25-30 cm se cortan a ras del árbol, sumergiendo la parte cortada en agua caliente (50°C) para cauterizar la herida y evitar la pérdida de savia. A continuación se procede a su plantación en macetas de plástico de color negro, empleando una mezcla a partes iguales de tierra franca de jardín, arena gruesa y mantillo. Estas macetas se colocan en un lugar cubierto, caliente, pero fuera de la acción directa de los rayos solares, donde se mantienen con buena humedad, hasta que emitan raíces y sean aptas para el trasplante.

Este procedimiento, por el que se obtienen plantas iguales a la originaria, tiene el inconveniente de que es muy laborioso, costoso y además obliga a mantener la plantación vieja un año más para obtener los renuevos necesarios.

Por todo lo anteriormente expuesto se recurre normalmente a la multiplicación por semillas.

El fruto contiene gran cantidad de semillas que están cubiertas de una capa gelatinosa, que ha de eliminarse para facilitar la germinación, frotando las semillas con la mano y un puñado de tierra, con dos telas o con una esponja de caucho. Después se lavan, se escurren y se colocan sobre una hoja de papel para que se sequen. La semilla de papaya sana, secada al aire, es

bastante duradera ya que guardada en un recipiente impermeable al aire con un poco de cloruro cálcico conserva su viabilidad por 2-3 años.

La siembra puede hacerse en el lugar definitivo, aunque es mejor proceder a la siembra previa en semillero. Estos se preparan en macetas de turba o plástico negro con una mezcla de tierra de jardín, arena gruesa y mantillo a partes iguales.

Las semillas, depositadas en las macetas, deben cubrirse con una capa de arena gruesa o vermiculita de 0,5 cm y colocarse en lugar sombreado.

La tierra del semillero debe mantenerse húmeda, pues a los diez días de la siembra comienza la germinación, colocándose a pleno sol cuando los cotiledones estén todavía verdes. Cuando las plantas alcanzan 10-15 cm, a los 2 meses aproximadamente, se transplantan al lugar definitivo.

El trasplante al terreno definitivo se realiza cuando las plantas tienen unos 10-15 cm de altura. Se abren hoyos de 0,5 m de anchura y 0,80 m de profundidad. Si no se estercoló se deben aplicar 5 kg aproximadamente de estiércol mezclado con 0,25 UF de potasio y 0,1 UF de fósforo, evitando que el estiércol esté en contacto con las raíces. Las plantas se deben enterrar al mismo nivel que tenían en el semillero, de manera que el cuello (inserción de raíces a tronco) esté justo a nivel del suelo, de lo contrario se pudriría el tallo. El marco de plantación es de 3 m entre filas y 2 m entre plantas.

En el caso de la multiplicación por semillas, es necesario, a la hora de plantar, tener en cuenta que podemos obtener diferentes resultados, según empleemos semillas procedentes de árboles femeninos, cuya flor haya sido

fecundada por polen procedente de árboles masculinos, o por polen de flores hermafroditas.

Así, si la flor fue fecundada por polen procedente de una flor masculina, al sembrar las semillas se producirán la mitad de plantas macho y la otra mitad serán plantas hembra. En este caso se sembrarán en cada maceta tres o cuatro semillas de las que saldrán plantas masculinas y femeninas, de forma que al hacer el trasplante se trasladan todas las plantas y en el primer año, al desarrollarse, las plantas florecen y es entonces cuando de cada conjunto se deja una sola planta, eliminando las otras. Normalmente se deja una planta macho por cada quince hembras, para que actúe de polinizadora. Según el número de semillas que introduzcamos en el hoyo tendremos las siguientes posibilidades de tener una planta macho o hembra (Rodríguez y Galán, 1992).

Nº PLANTAS / HOYO	PADRE (♂) Y MADRE (♀)	
	% HIJOS (♂)	% HIJOS (♀)
1	50	50
2	25	75
3	12,5	87,5
4	6,25	93,75

Tabla II: Posibilidad de obtener una planta macho o hembra según el número de semillas introducidas por hoyo.

Si queremos obtener semillas que produzcan sólo frutos femeninos y hermafroditas, será necesario forzar la polinización de una flor femenina con el polen recogido de una flor hermafrodita. En los estigmas de la flor femenina se deposita con un pincel el polen recogido de una flor hermafrodita. A continuación se cubren las flores así tratadas con una bolsita de plástico blanco o de celofán, permaneciendo así hasta que el fruto madure. Como cada fruto contiene alrededor de 800-1000 semillas, bastará con repetir esta operación en cuatro o cinco flores para disponer de una cantidad abundante de semillas. En este caso bastará con depositar un par de semillas por maceta y una vez que las plantas han alcanzado unos 10 cm se deja una sola. Si existe un buen mercado para los dos tipos de frutos hembras y hermafroditas no habrá ningún problema, pero si el mercado prefiere los frutos hermafroditas como ocurre en Hawaii o en Canarias, se plantará más de una semilla en cada hoyo y al empezar la floración se dejarán sólo los hermafroditas. Así el porcentaje de plantas hermafroditas que pueden obtenerse según el número de semillas que se planten por hoyo y quién sea el donante de polen y el receptor sería según Rodríguez y Galán (1992):

Nº DE PLANTAS POR HOYO	TIPO DE CRUCE		
	PADRE (♂) MADRE (♀)	PADRE (♀) MADRE (♀)	PADRE (♀) MADRE (♀)
1	33,0	50,0	66,7
2	54,8	75,0	88,9
3	69,0	87,5	96,3
4	97,0	93,7	98,8

Tabla III: Porcentaje de plantas hermafroditas que pueden obtenerse según el número de semillas plantadas y quién sea el donante y el receptor de polen.

Estas plantas no se podan y cuando tienen 3 años son demasiado altas y están muy expuestas a la ruptura, además son menos productivas, no interesando su explotación comercial, de ahí que se sustituyan por otro nuevo cultivo.

1.3.2. FACTORES QUE INCLUYEN EN EL DESARROLLO DE LA PLANTA.

Las condiciones esenciales para el buen desarrollo de la planta y el logro de una buena fructificación son la humedad y el calor. Puede resistir fríos ligeros pero si las temperaturas son bajas durante mucho tiempo se produce un retraso en el crecimiento y una merma en la producción.

Las temperaturas óptimas para el cultivo se encuentran alrededor de 25°C, considerándose límites térmicos extremos 20°C y 33°C, pues si la temperatura es inferior a 21°C o superior a 33°C se favorecerán los fenómenos de carpeloidía y esterilidad femenina respectivamente (Rodríguez, y Galán, 1992). Las zonas de cultivo en Canarias se emplazan según las condiciones de temperatura en las proximidades de la costa en la vertiente sur, siendo aconsejable la utilización de invernaderos fuera de las zonas más cálidas.

No es una planta sensible al viento aunque pudiera parecer lo contrario. El tallo de aspecto semejante a una palmera es muy flexible, y a él están sujetos los peciolo de las hojas y los pedúnculos de las flores, por lo que es muy difícil que se desprendan. El viento podrá balancear la planta, romper algunas hojas, pero no dañará ni flores ni frutos. En zonas ventosas se recomienda la utilización de cortavientos para evitar la pérdida foliar, principal responsable de la elaboración de nutrientes.

El riego en cultivos al aire libre, es 12000 m³/Ha/año aproximadamente, lo que equivale a 16 litros/planta/día. Sin embargo, en condiciones de invernadero, utilizando riego por goteo, el consumo puede reducirse a algo más de la mitad, 5-6 litros/planta/día.

En cuanto al abonado, un aporte continuo de nitrógeno favorece enormemente su crecimiento. El potasio, proporciona una mayor cantidad de azúcar y de sólidos solubles, y el fósforo aumenta el cuajado. Las recomendaciones de abonado por planta y día son de 0,336 g de fosfato monoamónico, 2,099 g de nitrato potásico y 0,857 g de nitrato cálcico. (Rodríguez y Galán, 1992).

La papaya puede adaptarse a una variada gama de suelos aunque es preferible que sean arenosos-limosos, con buena estructura, rico en materia orgánica y con un buen drenaje y aireación para evitar que se pudran las raíces. El pH óptimo está comprendido entre 5,5 y 6,5, pero puede cultivarse sin grandes problemas hasta un pH de 8,0. Tolera mejor los suelos ricos en sales que las plataneras, aunque en las zonas costeras los daños causados por la "maresía" son considerables.

Es una planta muy sensible a hongos de suelo, por lo que hay que realizar algún tipo de desinfección del suelo antes de la plantación. Los papayos son atacados por nematodos, arañas (araña roja), pulgones, hongos, lepidópteros...; sin embargo se conoce la manera de combatir estas plagas y enfermedades.

1.4. EL FRUTO.

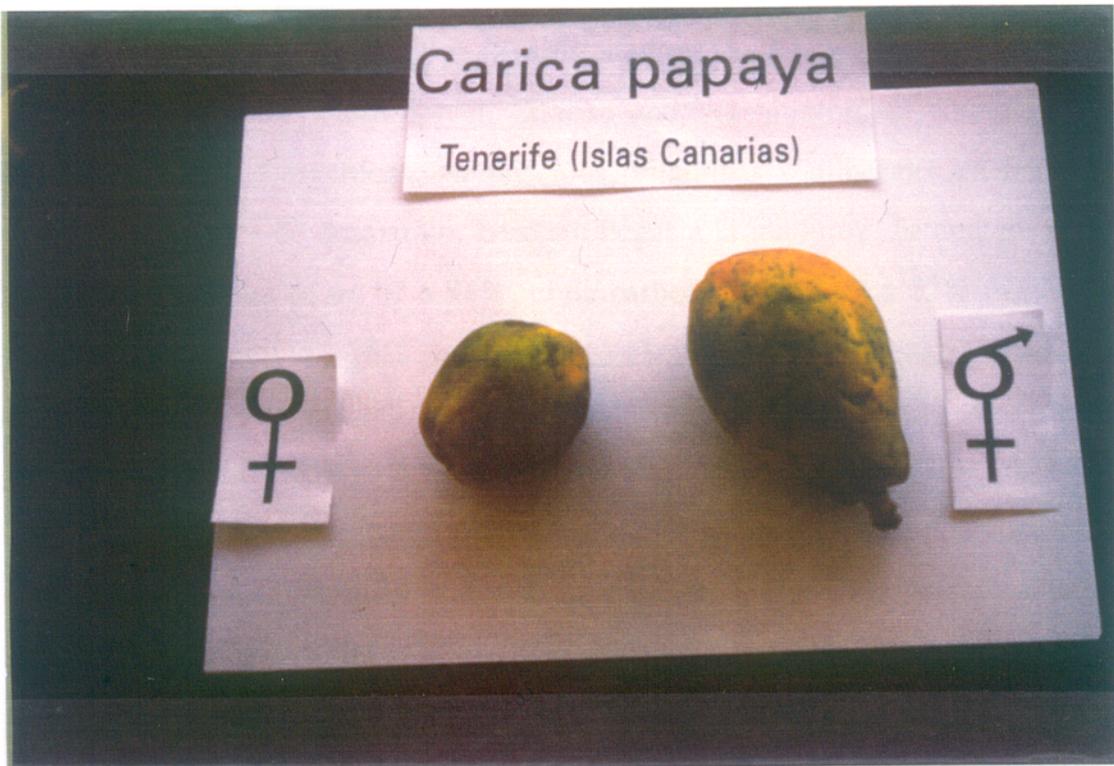
1.4.1. FRUCTIFICACION.

La fructificación de la papaya se inicia a los 10-12 meses, dependiendo del clima y de la variedad. Algunas veces es aconsejable el aclareo de los flores y frutos defectuosos, para evitar que los frutos salgan amontonados y con deformaciones. También se deben eliminar las hojas que estén intercaladas con los frutos.

En el cultivar Sunrise se ha observado, que la longitud entre los nudos es mayor (3,5 cm) que en otros cultivares del tipo Solo, lo que favorece que puedan existir 2-3 frutos por pedúnculo sin que se produzcan daños por rozamiento. Además, las primeras flores se inician a una altura inferior a 1 m, lo que facilita la recolección de los frutos.

El tiempo necesario desde que se abre una flor hasta que madura su fruto es de aproximadamente 5-6 meses, aunque depende de la climatología y de la variedad.

Los frutos del cultivar "Sunrise" hembras son globosos mientras que los hermafroditas son piriformes, ambos son de menor tamaño que los de otras variedades. Tienen una piel fina y su pulpa es de color naranja brillante, jugosa, perfumada y azucarada, de sabor muy agradable. La cavidad central está rellena de gran cantidad de semillas de color negro, redondas, rugosas y del tamaño de un guisante. Los frutos femeninos formados partenocárpicamente no portan dichas semillas.



Fotografía 5: Morfología de los frutos de papaya hermafrodita y hembra.

1.4.2. COMPOSICION DEL FRUTO.

1.4.2.1. COMPOSICION QUIMICA.

La papaya es un fruto climatérico. El climaterio es un estado de autoestimulación, en el que se produce un cambio de crecimiento a envejecimiento de los frutos, observándose un incremento repentino en la actividad respiratoria, así como cambios bioquímicos iniciados por la producción autocatalítica de etileno (Rhodes, 1970). Blakesley y col. (1979), determinaron que la calidad organoléptica, el perfil de volátiles y el contenido lipídico dependía del estado de madurez del fruto.

Selvaraj y col. (1982), analizaron en cuatro cultivares de papaya (Coorg Honey Dew, Pink Flesh Sweet, Sunrise and Washington) el contenido en azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos, vitaminas y minerales en frutos a distintos estados de desarrollo, pero sin llegar a la madurez. El contenido en humedad variaba de un 87 a 94%, el de carbohidratos de 2 a 12% (sacarosa 7-50%, glucosa 14-78% y fructosa 13-50% del contenido total de carbohidratos), la materia seca aumentaba de un 7% a los 15 días de la formación del fruto, a 13% en la cosecha. Durante este período, hay una débil disminución del contenido en sólidos insolubles en alcohol, almidón y algunos minerales y un aumento en azúcares. La concentración de ácidos varía mucho de su formación a maduro. El contenido en hierro aumentaba con el desarrollo del fruto, mientras que el potasio, fósforo y calcio no sufrían apenas modificaciones. El contenido en vitamina C y A, así como en proteínas aumentaba con la maduración.

El cambio más significativo que ocurre en la maduración del fruto es la aparición de azúcares solubles, cuyo contenido y clase varía según el tipo de fruto, variedad y condiciones climáticas. Los polisacáridos se metabolizan en azúcares, hay un aumento en el dulzor. Según Chan y col. (1979) el azúcar predominante en la papaya madura es sacarosa (48,3%), seguido de glucosa (29,0%) y fructosa (21%), y trazas de pseudoheptulosa (Ogata y col., 1972). El enzima que cataliza la inversión de sacarosa, β -fructofuranosidasa, también está presente (Chan y Kwok, 1975). Al ser más elevado el contenido en azúcares que en ácidos, el sabor dulce predomina. La acidez titulable aumenta a medida que el fruto madura a 24°C pero una vez alcanzada, disminuye (deArriola y col., 1975). El contenido en ácidos orgánicos de la papaya madura es más bajo que el de otras frutas y esto contribuye a su agradable sabor dulce (Chan y col., 1971).

En la papaya, a diferencia de la mayoría de las frutas, se produce un aumento en el contenido de vitamina C a medida que se desarrolla el fruto, alcanzándose el máximo valor en la madurez (55 mg/100 g de producto comestible).

El mineral más abundante encontrado en papaya es el potasio, que se suele encontrar combinado con algunos ácidos orgánicos (Awada y Suehisa, 1973).

El sabor y aroma "flavor" de la papaya está constituido por un gran número de compuestos volátiles, siendo el mayoritario el linalol, seguido del bencilisotiocianato (Flath y Forrey, 1977).

Durante la maduración la pulpa de papaya sufre un cambio de color de verde a naranja. Este proceso es debido a la pérdida de clorofilas y a la síntesis de carotenoides (MacKinney, 1961; Yamamoto, 1964). Estos cambios de pigmentación se producen al sufrir los cloroplastos cambios estructurales originándose los cromoplastos.

A lo largo del período de maduración, los carotenoides del cloroplasto (α y β -carotenos, luteína, violaxantina y neoxantina) disminuyen y aumentan los carotenoides del cromoplasto (criptoxantina, anteraxantina y zeaxantina), al tiempo que se produce una carotenogénesis, siendo los productos mayoritarios en la fruta madura el α y β caroteno (deArriola y col., 1980; Ikemefura y Adamson, 1985).

Existe muy poca información sobre la relación entre el cambio de color de la pulpa y el patrón de carotenoides en distintos estados de maduración.

Los últimos estudios epidemiológicos y de laboratorio realizados, han dado lugar a un incremento del interés sobre los carotenoides, pues estos no sólo son precursores de la vitamina A, sino que además son posibles compuestos anticancerosos y protectores de la mucosa gástrica (Peto y col., 1981; Mozsik y col., 1984; Colditz y col., 1985).

Asimismo, parece ser que pueden prevenir la aparición de cáncer de piel inducido tanto por luz UV como por la combinación de sustancias carcinógenas con radiaciones UV. Los carotenoides actúan uniéndose a radicales libres y peróxido (Mordy, 1993). Existen otros alimentos pobres en β -caroteno pero que contienen carotenoides oxigenados (xantofilas) que también están relacionados con la protección contra el cáncer (Shekelle y col., 1981; Moon y Micozzi, 1988).

1.4.2.2. COMPOSICION BIOQUIMICA.

Los enzimas son proteínas especializados en catalizar reacciones biológicas, por lo tanto, influyen en la calidad final de los productos vegetales. Se clasifican en función del tipo de reacción que catalizan en seis grupos:

- * Transferasas. Catalizan reacciones de transferencia de grupos funcionales.
- * Liasas. Catalizan reacciones de adición a dobles enlaces.
- * Isomerasas. Catalizan reacciones de isomerización.
- * Ligasas. Catalizan reacciones de formación de enlaces con intervención del ATP.
- * Hidrolasas. Catalizan reacciones de hidrólisis.
- * Oxido-reductasas. Catalizan reacciones de oxido-reducción.

En productos vegetales la mayoría de las reacciones catalíticas enzimáticas, son fruto de la actuación de hidrolasas y oxido-reductasas (Scott, 1975).

Durante la maduración de los frutos se produce una disminución de la firmeza al originarse una desmetilación y despolimerización enzimática de las protopectinas, convirtiéndose en pectinas solubles. Se forman polímeros de menor peso molecular y menor número de grupos metoxilo, que son insuficientes para mantener la firmeza de la fruta. En este proceso están implicadas dos enzimas pécticas que son la poligalacturonasa (PGasa; E.C. 3.2.1.15) y la pectinmetilesterasa (PME; E.C. 3.1.1.11) (Salunkhe, 1984).

La actividad de la nitrato-reductasa (E.C. 1.6.6.2) varía con la madurez, localizándose en mayor proporción en el exocarpio. Este enzima controla los niveles de nitrato causantes de las alteraciones que se producen en papaya enlatada. Para reducir el contenido de nitrato del mesocarpio Menery y Jones, (1972), propusieron acelerar la reducción enzimática exponiendo los frutos cosechados a la luz.

El enzima mirosinasa o tioglucosidasa (E.C. 3.2.3.1.), hidroliza bencilglucosinolato originando bencilisotiocinato responsable del desarrollo de olores indeseables durante el almacenamiento (Tang, 1971).

Otro enzima hidrolítico es la invertasa o β -fructofuranosidasa (E.C. 3.2.1.26), que actúa sobre azúcares no reductores, sacarosa, convirtiéndolos en azúcares reductores, glucosa y fructosa (Chan y Kwok, 1975, 1976), aumentando la susceptibilidad al pardeamiento no enzimático. Su rápida actividad hidrolítica, hizo que muchos autores pensarán en la no existencia de

sacarosa en papaya. Sin embargo, esto fue desmentido más tarde por Chan y Kwok (1976) que determinaron que el 50% de la sacarosa se perdía a los 2,6 minutos durante el proceso de extracción previo a su análisis.

La fosfatasa ácida (E.C. 3.1.3.2) hidroliza los puentes P-O de monoésteres ortofosfóricos produciendo ROH y H₃PO₄, que disminuye el pH al realizar y almacenar puré de papaya (Carreno y Chan, 1982).

La catalasa (E.C. 1.11.16) es un enzima estable durante la refrigeración y la congelación de los frutos. Sin embargo, se inactiva al acidificar el medio, pH 3.5, y por calentamiento (Chan y col., 1978).

En todos los productos vegetales existe un grupo de enzimas, oxido-reductasas, que son la causa de la mayor parte de las alteraciones de la calidad sensorial. Estos enzimas pueden producir pardeamientos enzimáticos, aparición de aromas extraños y decoloración de ciertos pigmentos, con el consiguiente descenso del valor nutritivo al disminuir principalmente el contenido vitamínico (Aylward y Haisman, 1969).

En ocasiones, cuando un fruto se magulla, corta, pela,... sufre un oscurecimiento rápido al exponerse al aire, pues se produce una conversión de los compuestos fenólicos a melaninas, que originan una coloración parda (Eskin, 1990). Los principales enzimas con actividad oxido-reductasa presentes en los productos vegetales son:

* Lipoxigenasa. Es el enzima responsable de la oxidación de ácidos grasos esenciales como linoleico, linolénico y araquidónico, del desarrollo de malos sabores y de la oxidación de carotenos y otros pigmentos.

- * Alcohol-deshidrogenasa y aldehído-deshidrogenasa. Estos enzimas reducen aldehídos a alcoholes o los oxidan a ácidos, siendo por tanto NAD^+/NADH dependientes. Estas reacciones están relacionadas con una reducción de aldehídos asociados a malos olores y con el desarrollo de ésteres que son los componentes mayoritarios responsables del sabor en algunas frutas.

- * Peroxidasa. Se considera como índice de maduración y senescencia, pues está relacionada con la biosíntesis de etileno, el balance hormonal, la integridad de la membrana, así como con el control de la respiración (Haard, 1973). Además parece ser que participa en la degradación de clorofilas.

- * Polifenoloxidasas. La actividad de este enzima varía marcadamente entre productos vegetales pertenecientes a distintas variedades de una misma especie, según el grado de madurez, las condiciones de cultivo... Su importancia deriva de su implicación en los mecanismos de pardeamiento enzimático, que no sólo conducen a alteraciones en el color, sino que también afectan a su sabor y valor nutritivo. No obstante, en determinados alimentos como té, cacao, café, ciruelas, dátiles y uvas negras, la acción de este enzima (polifenoloxidasas) es imprescindible para que alcancen sus propiedades características (Vamos-Vigayazo, 1981).

El papel de estos enzimas en los procesos degradativos que tienen lugar en los productos vegetales, es muy complejo, participando en numerosas rutas degradativas, que en muchos casos se interconexionan.

Los sistemas enzimáticos objeto de estudio en esta Memoria de Tesis Doctoral han sido la Peroxidasa y la Polifenoloxidasas.

1.4.3. RECOLECCION Y CONSERVACION DEL FRUTO.

Si la fruta va destinada a mercados alejados, se debe cosechar cuando empieza a amarillear, mientras que si va destinada al consumo en mercados locales, puede dejarse en el árbol 2-3 días más. Para recoger el fruto se corta el pedúnculo con una navaja afilada y se coloca en recipientes acolchonados, en una sola capa, para evitar que se golpeen o machaquen.

Los frutos recogidos cuando comienzan a amarillear desarrollan un buen sabor conservándolos a temperaturas tropicales. Conservándolos a 10-12°C se prolonga su vida pero no alcanzarán su sabor característico. Los frutos mantenidos a una temperatura igual o por debajo de 7,2°C no maduran normalmente cuando se llevan a un local con una temperatura adecuada para que maduren, porque el enfriamiento ha determinado algún cambio, que interfiere el proceso normal de maduración del fruto (Salunkhe, 1984).

Además el frío no sólo afecta al desarrollo interno de las papayas, sino que también produce pardeamiento de la piel y una pérdida de acidez de la pulpa. Este fenómeno, conocido como "daño por frío" (chilling injury), puede ser explicado por una disminución en la síntesis de algunos compuestos de importancia para el fruto o por una aumento en la producción de sustancias tóxicas (Wilkinson, 1970). Los daños causados por el frío pueden hacer que la papaya no madure de forma adecuada, que no se desarrolle color en la pulpa, se acumule agua en los tejidos, persista el color verde en la piel, se haga más susceptible al ataque de hongos...(Rolz, 1973).

1.4.4. TRATAMIENTOS POST-COSECHA.

Las papayas que no puedan consumirse o procesarse inmediatamente, se almacenan a 10-13°C durante 10-15 días. Sin embargo, muchos frutos pueden perderse debido a algún deterioro post-cosecha. Distintos autores han investigado el método más aconsejable para evitar estas pérdidas. Así, los autores Akamine y Arisumi (1953) trataban las papayas, introduciéndolas en agua caliente a 49°C durante 20 minutos. Couey y Farias (1979), además del tratamiento con agua caliente realizaba un recubrimiento con una cera que contenía algún producto de acción fungicida.

Asimismo, se ha ensayado la conservación en atmósferas controladas (CA). deArriola y col. (1980) concluyen que su utilización conlleva un aumento en el coste del producto, pero no necesariamente implica una mayor calidad de la fruta.

El almacenamiento a presión subatmosférica (20 mm Hg, 10°C, y 90-98% de humedad relativa) en contenedores hipobáricos durante los 18-21 día de embarque, inhiben la maduración y el desarrollo de enfermedades (Alvarez, 1980).

La irradiación gamma (75 Krad) puede ser suficiente para desinfectar estos productos y, por tanto, aumentar su tiempo de almacenamiento al retrasar el proceso de maduración (Clarke, 1971). Beyers y col. (1979), llevaron a cabo el estudio de algunos constituyentes como los azúcares totales, proteínas, lípidos, vitaminas y elementos traza, en papayas sometidas y no sometidas a radiación, no observando diferencias entre ambas.

1.4.5. PROCESADO DE LOS FRUTOS.

Los problemas de transporte y comercialización en fresco de la papaya han conducido a la necesidad de un estudio sobre la aptitud de esta fruta a diferentes formas de procesado, que nos permitan obtener un producto, que pueda llegar al consumidor con unas características lo más similares posibles a las del fruto fresco.

En los últimos años, la papaya se ha procesado de diferentes formas. Distintos autores hacen una revisión de estos productos procesados como Chang y Tang (1979), deArriola y col. (1980) y Jagtiani y col. (1988).

Según el tipo de procesado final:

*** Papaya enlatada.**

Las papayas maduras, lavadas, peladas y sin semillas se trocean en cubos y se introducen en un envase metálico (lata), añadiendo almíbar de 40° Brix, que contiene 0,75% de ácido cítrico, y dejando un espacio de cabeza de 7,9 mm. Mediante vapor o agua caliente se eleva la temperatura a 71°C, se cierran las latas y se introducen en agua hirviendo hasta que el producto alcance una temperatura de 90,6°C. A continuación, las latas se enfrían rápidamente a 37,8°C (Chan, 1983).

* Papaya congelada.

La papaya, como ya se ha indicado, puede magullarse con facilidad y su cavidad central está llena de pequeñas semillas que habría que eliminar antes de la congelación. Era necesario por tanto, diseñar un aparato que, sin dañar el fruto, pele y remueva las semillas. Chan, (1977) diseñó un método para eliminar las semillas introduciendo un chorro de agua a través de un orificio realizado en el fruto, de manera que las semillas salen por otro hueco practicado en la parte posterior del mismo. La congelación se llevó a cabo utilizando túneles de congelación a -40°C , inmersión en una solución de cloruro sódico y etanol a -23°C , fluidos criogénicos...

Cuando la papaya se procesa en forma de puré, se origina una considerable gelificación de origen enzimático que, al progresar ocasiona el desarrollo de malos olores y sabores. Brekke y col. (1973), desarrollaron un procedimiento para evitar, que al realizar este tipo de procesado, se indujeran estos cambios enzimáticos así como la modificación del sabor-olor del producto procesado. Este procedimiento consiste en minimizar la ruptura de las semillas durante las etapas previas a la fabricación de puré, con lo que disminuye la salida de la mirosinasa y su sustrato bencilglucosinolato, evitándose el desarrollo de malos sabores. Por otra parte, para inactivar la pectinmetilesterasa, que es la responsable de la gelificación, el puré nada más fabricarse se acidifica con ácido cítrico hasta pH 3,5, con lo que se consigue, además la inhibición del crecimiento de microorganismos. El puré así fabricado está desprovisto de malos olores y sabores, y no se forman geles durante el almacenamiento en estado congelado, tiene menor carga microbiana y posee menos partículas de semillas. Otros autores han utilizado técnicas de procesado aséptico, mediante el empleo de un intercambiador de calor que

esteriliza el puré (Chan y Cavaletto, 1982).

El proceso de elaboración de concentrados de papaya consiste en despectinizar primeramente el puré, adicionando una enzima pectinolítica para reducir la consistencia y a continuación concentrarlo en un evaporador a vacío (Chan y col., 1979).

Los zumos, néctares, y otras bebidas se formulan básicamente añadiendo agua, edulcorantes y acidulantes al puré o pulpa de papaya.

1.5. CONGELACION DE FRUTAS.

1.5.1. OPERACIONES PREVIAS AL PROCESO DE CONGELACION.

Las materias primas destinadas a convertirse en alimentos conservados por congelación deben disponerse y prepararse tecnológicamente antes de someterse a este procesado. Estas operaciones previas son:

* Clasificación. La materia prima se ordena de acuerdo con determinados criterios de calidad.

* Calibrado.

* Limpieza o enjuagado. Eliminación de impurezas minerales, suciedades orgánicas...

* Pelado, deshuesado y troceado. Eliminación de porciones vegetales no comestibles o de inferior valor. El pelado puede realizarse por métodos mecánicos, térmicos, químicos y mixtos.

Para preservar las características sensoriales de las frutas frescas (textura, color, aroma y sabor), que son las más valoradas por el consumidor, existen algunos procesos previos a la congelación:

* Escaldado.

Consiste en someter el producto a un tratamiento térmico, inactivando sistemas enzimáticos causantes de las alteraciones de calidad, que actúan durante el almacenamiento del producto congelado. Además reduce la posibilidad de oxidaciones al eliminar el oxígeno ocluido en los tejidos y mejora la calidad higiénica de los productos, disminuye los residuos de pesticidas y microorganismos no esporulados. Se utiliza en hortalizas y frutas con fines industriales. Sin embargo no se emplea en frutas destinadas al consumo directo porque se produce una notable disminución de la firmeza, alteración del aroma y sabor, y pérdidas nutricionales, bien por lixiviación de las sustancias solubles o por la destrucción de compuestos termolábiles.

* Edulcorado.

Consiste en una inmersión de los trozos de fruta en un jarabe, normalmente de sacarosa, provocando por diferencia osmótica, la salida de

agua desde el tejido vegetal a la solución, llenando los espacios intermedios libres, con lo que se aísla el producto de la acción del oxígeno atmosférico, y por tanto, reduciendo la posibilidad de oxidaciones. Además, los jarabes se oponen físicamente a la pérdida de aroma, refuerzan el sabor de las frutas y disminuyen la cantidad de agua presente en el tejido con lo que pueden, en ocasiones, mejorar la textura. La concentración del jarabe a utilizar varía en función de la fruta considerada; 30-40 °Brix para cerezas, peras y ciruelas, 40-50 °Brix para plátanos y manzanas, 40-60 °Brix para fresas, melocotones y albaricoques (Philippon, 1975).

* Empleo de aditivos.

El hecho de que la mayoría de las frutas no puedan ser escaldadas, para inactivar las enzimas responsables del pardeamiento y degradación de los pigmentos, implica recurrir a la utilización de aditivos químicos (ácido ascórbico 0,1-0,3%, ácido cítrico 0,5-1,0%, anhídrido sulfuroso 60-80 ppm o cloruro de estaño II 100-200 ppm) para que conserven un color semejante al de las frutas frescas (Gruda y Postolski, 1986).

Se ha ensayado el empleo de pectinas y alginatos para mejorar la firmeza de las frutas congeladas, pero los resultados obtenidos no han sido demasiado buenos.

1.5.2. PROCESO DE CONGELACION.

El proceso de congelación consiste en un enfriamiento del producto hasta que todos sus puntos tengan una temperatura inferior al punto de

congelación del tejido (Instituto del Frío, 1986). En la práctica, se considera que el alimento está congelado cuando la temperatura en su centro térmico es inferior a -10°C .

La temperatura de congelación de un alimento depende de la concentración de solutos (sólidos solubles), especialmente azúcares, sales y ácidos. La temperatura a la que congela un tejido, es inversamente proporcional al contenido en sólidos solubles. Dado que el contenido de una célula vegetal es complejo, no es posible definir un único punto de congelación, sino que se establecen una serie de puntos eutécticos, que van a ser las temperaturas a las que cada componente o mezcla de ellos congelará. La temperatura de congelación del agua es sólo el primero de estos puntos, aunque sea el más importante por ser el componente mayoritario en las frutas. Será necesario, por tanto, tener en cuenta la formación de cristales que se produce al congelar. El proceso de cristalización se produce en dos fases que transcurren casi simultáneamente: la nucleación y el crecimiento de los cristales. La formación de estos cristales de hielo produce un daño irreversible en la estructura de los tejidos vegetales (Reeve y Brown, 1966; Brown, 1979). La localización y el tamaño de los cristales de hielo depende de la velocidad de congelación.

Los daños que origina una congelación no adecuada pueden ser mecánicos, al producirse un aumento de volumen al congelarse el agua, que desgarrar y fragmenta la membrana y químicos que derivan de la concentración de solutos, que se origina al quedar la mayoría del agua intracelular

congelada, originándose cambios en el pH, oxidación de lípidos...(Reid, 1993).

Por otra parte, la pérdida de agua de los sistemas bioquímicos supone un desequilibrio, que no se reemplaza totalmente con la descongelación. Las membranas celulares sufren una modificación en la permeabilidad y en su elasticidad, debido a que las soluciones coloidales de las mismas quedan irreversiblemente deshidratadas (Fennema y Powerie, 1964). Como consecuencia de esta deshidratación, se produce una disminución en la rigidez del producto congelado y una pérdida irreversible de fluido (exudado) tras la descongelación.

La intensidad de los daños que la congelación produce sobre la pared celular depende no sólo de la estructura celular de la fruta considerada, sino también de la velocidad de congelación.

Desde un punto de vista físico, los tejidos vegetales pueden considerarse como soluciones acuosas diluidas. Al enfriar el alimento por debajo de 0°C, el hielo comienza a formarse (temperatura crioscópica o comienzo de la congelación), que es además la temperatura característica de fusión (temperatura a la que funde el último cristal de hielo en una descongelación suficientemente lenta). La temperatura de comienzo de la congelación depende en gran medida de la concentración molar de las sustancias disueltas y no de su contenido en agua.

Una vez que el agua ha comenzado a congelar, la cristalización es función de la velocidad de enfriamiento y de la velocidad de difusión del agua a partir de las disoluciones o geles que bañan la superficie de los cristales de

hielo.

Cuando se realiza una congelación lenta, los primeros cristales se forman en los espacios intercelulares, el agua se condensa y aparecen los primeros núcleos de cristalización. Como consecuencia del gradiente de presiones que se crea entre la célula y estos cristales de hielo extracelulares, se origina una difusión de agua del interior al exterior de la célula, donde el tamaño de los cristales crece progresivamente. Esta pérdida de agua tiene como consecuencia directa una concentración de solutos en el fluido celular, aumentando la temperatura de la fase no congelada, haciéndose más difícil la formación de núcleos de cristalización intracelulares. El crecimiento de los cristales intercelulares produce una separación progresiva de las células y como consecuencia una plasmólisis del protoplasma celular, con ruptura total en algunas ocasiones.

Si la velocidad de congelación del tejido vegetal es rápida, es decir si se alcanza la temperatura de congelación del líquido intracelular antes de que su concentración disminuya por difusión del agua, se produce una nucleación de cristales dentro y fuera de la célula, que da lugar a un gran número de cristales, intra y extracelulares, y que además son de reducido tamaño.

La utilización de una velocidad de congelación rápida conlleva una serie de ventajas:

* Firmeza semejante a la del producto fresco.

* Mayor estabilidad bioquímica y nutricional durante la conservación al estado congelado del producto.

* Sensible reducción de exudado.

Las frutas por su alto contenido en agua y sensibilidad a los cambios en la firmeza requerirán la utilización de congelaciones ultrarápidas, pues una congelación lenta conduciría a una excesiva ruptura de las paredes celulares, con el consecuente ablandamiento de tejidos y una gran cantidad de exudado al ser descongelado.

El proceso de congelación termina cuando la mayor parte del agua congelable se transforma en hielo en el centro térmico del producto. Para la mayoría de los productos, la temperatura del centro térmico coincide en ese momento con la temperatura de almacenamiento.

Independientemente de las ventajas e inconvenientes que podamos encontrar con la utilización de los diversos procesos y métodos de congelación, los frutos destinados a esta transformación tecnológica deben presentar como principales características: a) excelentes cualidades organolépticas, b) textura inicial firme, así como tras la aplicación de los pretratamientos de congelación, c) mínima tendencia al pardeamiento, y d) adecuado grado de madurez. Es impensable que se pueda obtener un buen resultado del proceso, partiendo de una materia prima deficiente.

1.5.3. MODIFICACIONES DE LA CALIDAD DURANTE LA CONSERVACION EN ESTADO CONGELADO.

De manera general, durante el almacenamiento los productos sufren una pérdida gradual de la calidad, acumulativa e irreversible, que resulta de los distintos efectos individuales o combinados de las modificaciones físicas, físico-químicas, químicas o bioquímicas.

1.5.3.1. CAMBIOS FISICOS.

Los cambios físicos que afectan a la calidad de frutas congeladas durante su conservación, tienen que ver con los fenómenos de recristalización y sublimación, relacionados con la estabilidad de los cristales de hielo formados en el interior o en la superficie de los tejidos durante la congelación del producto.

Si durante la conservación hay fluctuaciones de temperatura, pueden fusionarse parcialmente los cristales de hielo, y al descender de nuevo la temperatura se formarán cristales de mayor tamaño que en la descongelación del producto producirán un gran exudado (Calvelo, 1981). Esto provoca que se pierdan las ventajas que tiene una congelación rápida cuando se aplica a frutas (Jul, 1984).

La humedad que existe sobre la superficie de una fruta congelada (95%-99,5%) es siempre mayor que la del lugar de almacenamiento, creándose un

intercambio de humedad entre el alimento y el medio en el que se encuentre. Para evitar la desecación de la fruta, se recurre a utilizar envases de baja permeabilidad al vapor de agua ($<1 \text{ g/m}^2/24 \text{ h a } -20^\circ\text{C}$) (Gruda y Postolski, 1986). Además el envase debe envolver completamente el producto para evitar que en los espacios intermedios llenos de aire, se establezcan diferencia de presiones parciales que provoquen la difusión del vapor de agua. Por esta razón, se utiliza cada vez más el envasado a vacío que envuelve perfectamente las frutas evitando su desecación. Una desecación excesiva del producto provoca pérdidas de peso, aceleración de los cambios oxidativos en la superficie del producto, produciéndose una quemadura del producto o "Freezer burn".

1.5.3.2. CAMBIOS QUIMICOS Y BIOQUIMICOS.

Durante la conservación de frutas congeladas, pueden ocurrir reacciones químicas, enzimáticas o no, que son especialmente importantes por su influencia en la calidad final del producto congelado. Estas reacciones están asociadas con la aparición de olores y sabores extraños (off-odors, off-flavors), cambios de color debidos a la degradación de pigmentos y pardeamientos, y pérdida nutricional por reacciones de oxidación. Estas posibles vías degradativas del producto congelado serán estudiadas con mayor profundidad en la discusión de los resultados de la presente Tesis Doctoral.

La velocidad de una reacción depende de la constante de velocidad de reacción (k), la concentración y del orden de reacción. De estos tres factores, sólo k depende de la temperatura, por lo tanto la velocidad de reacción oscilará con la temperatura de la misma forma que lo hace k (Ecuación de

Arrhenius).

$$\ln K = \ln A - \frac{E_a}{RT}$$

$$K = A \cdot e^{-\frac{E_a}{RT}}$$

- K : Cte. de velocidad de reacción. A : Factor de frecuencia.
R : Cte. de los gases.
Ea : Energía de activación.
T : Temperatura.

Al descender la temperatura de los tejidos , se produce una disminución de la velocidad a la que se desarrollan las reacciones químicas. En las reacciones no enzimáticas existe una relación logarítmica entre la velocidad de reacción y la temperatura a la cual tiene lugar. Esta reacción puede también darse en reacciones enzimáticas cuando éstas se desarrollan a temperaturas inferiores a las necesarias para producir la desnaturalización térmica del enzima.

Cuando las reacciones son enzimáticas, las temperaturas por debajo del punto de congelación, hacen que disminuya la constante de la reacción. Si las reacciones son no enzimáticas la velocidad de reacción es mayor en estado congelado que a temperaturas superiores al existir mayor concentración de los reactivos de la fase líquida remanente, producida por la formación de cristales

de hielo. Sin embargo a temperaturas por debajo del punto de congelación, este efecto se ve compensado por el fuerte descenso de la velocidad de reacción y comienza por lo tanto, a disminuir la constante de reacción observada.

Otro efecto de la temperatura sobre la cinética de las reacciones químicas es un cambio en el orden de reacción. Tras la congelación, la modificación en la concentración de los reactivos puede hacer que se modifique el factor limitante de la velocidad de reacción (Zeuthen y col., 1983).

Asimismo, algunas de las alteraciones químicas pueden ser debidas a la disminución en la actividad de agua (a_w) del tejido. Por una parte, retrasa el crecimiento de microorganismos, se relantizan las reacciones enzimáticas, y se retarda el pardeamiento no enzimático; pero por otra, se acelera la velocidad de autoxidación de lípidos, aunque no tan importante como la que ocurre cuando el producto está deshidratado (Labuza, 1970).

1.5.3.3. FACTORES TIEMPO, TOLERANCIA Y TEMPERATURA (TTT).

Normalmente, como se ha expuesto hasta ahora, el descenso de la temperatura, lentifica las reacciones químicas, especialmente las que influyen sobre la calidad de los alimentos congelados. Para casi todos estos productos, la duración posible de almacenamiento aumenta cuando la temperatura de

conservación disminuye, al menos entre -25 y -40°C (Instituto Internacional del Frío, 1990).

El efecto combinado de ambos factores, tiempo y temperatura, determinan la tolerancia de los productos a la conservación en estado congelado. Estos factores son conocidos como los factores TTT (tiempo-temperatura-tolerancia).

Para cada alimento existe una correlación entre la temperatura de conservación en estado congelado y el tiempo a partir del cual se revela una pérdida determinada de calidad. Esta correlación se representa mediante coordenadas semilogarítmicas, de forma que la pendiente de la curva varía en función del alimento considerado. A partir de la pendiente de estas curvas TTT se puede calcular el efecto de la temperatura de conservación sobre la estabilidad del producto, utilizándose el factor Q_{10} , que indica cuantas veces se acrecienta el tiempo durante el cual el producto conserva su calidad cuando la temperatura disminuye 10°C . Este factor no depende sólo del producto sino también del criterio de calidad adoptado. Además, el Q_{10} no es constante en una larga gama de temperatura, la relación no es rigurosamente exponencial por debajo de -20 a -25°C , de ahí que los valores de este factor deban ir acompañados de la indicación del intervalo de temperatura a la cual se ha aplicado.

Se puede definir como conservación práctica de almacenamiento de un producto en estado congelado, como el período durante el cual el producto conserva sus propiedades características y es válido para su consumo directo o para la transformación a la cual se destina.

En la bibliografía también encontramos definido el término "conservación de alta calidad" o HQL (High Quality Life), que nos indica el tiempo que transcurre entre el momento en que se congela un producto de excelente calidad y el momento en que se detecta, por apreciación sensorial una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,01$), en relación con la calidad inmediatamente antes de la congelación. Este factor se determina a través de un panel de catadores que, en una prueba triangular, tienen que distinguir entre el producto y un control conservado a -40°C . Cuando un 70-80% de los catadores sean capaces de apreciar diferencias se habrá alcanzado la conservación de alta calidad (HQL) (Guadagni, 1969).

1.5.3.4. FACTORES PRODUCTO, PROCESADO Y ENVASADO (PPP).

Estos factores son determinantes para la calidad del producto, junto a la temperatura y duración del almacenamiento. En consecuencia una "curva TTT", sólo es válida para un determinado alimento congelado, con una determinada calidad de materia prima y un determinado procesado y envasado.

Cuando los productos se manipulan y mantienen en condiciones excepcionalmente buenas antes de ser preparados o congelados, su conservación puede ser más prolongada en el tiempo. Esto nos indica que se debe seleccionar el cultivar y la madurez más adecuada.

Igualmente hay que seleccionar el proceso de congelación que menos

dañe a nuestro producto, pudiendo incorporar ingredientes con acción antioxidante u otro efecto conservador, o recurrir al escaldado, glaseado, adición de jarabes...

La duración de conservación de un producto es tanto más larga cuanto más protegido esté contra la oxidación y la deshidratación. En el curso de los últimos años ha adquirido un interés creciente el embalaje a vacío, sobretodo para aquellos productos que se deterioran más rápidamente durante el almacenamiento frigorífico, pues el embalaje se adapta más a la superficie del producto.

1.5.4. DESCONGELACION.

La calidad de un producto en estado congelado puede alterarse si la descongelación no se realiza adecuadamente. La duración total de este proceso es el tiempo necesario para que la temperatura de un producto evolucione de su nivel inicial, estado congelado, hasta aquel en que no quede nada de hielo en el producto. Se considera que la descongelación ha sido completa cuando la temperatura en el centro del producto alcanza los 0°C.

Las frutas enteras, con hueso, sin pelar o troceadas, congeladas sin la adición de antioxidantes, en el proceso de descongelación pueden pardear rápidamente si su contenido en polifenoloxidasa es muy elevado, como es el caso del plátano, manzana... En este caso los hornos-túneles de microondas

tienen un porvenir de uso ventajoso, a pesar de su elevado precio, porque reducen mucho el tiempo de descongelación (Instituto Internacional del Frío, 1990).

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS.

En los últimos años, el cultivo de papaya (*Carica papaya*, cultivar Sunrise), se ha incrementado notablemente en ciertas zonas de Hawái, Méjico, España (Islas Canarias)... Sin embargo, la susceptibilidad que presentan estos frutos durante el transporte limita seriamente sus posibilidades de comercialización.

Como ya se describió en la introducción, existen distintos estudios realizados con objeto de alargar la vida comercial de este fruto, como el empleo de atmósferas modificadas, radiaciones ionizantes... Estas técnicas han tenido hasta el momento un éxito muy relativo, por lo que el estudio de otros procesos que aumenten la conservación y mantengan la calidad nutritiva y las características sensoriales, durante períodos de tiempo suficientemente largos, son de gran interés a nivel científico e industrial. Este tipo de procesos facilitarían las exportaciones y la comercialización de frutos a lo largo de todo el año.

Además, la papaya está adquiriendo cada vez mayor auge por su alto contenido en provitamina A y vitamina C y por ser una de las frutas más hipocalóricas. Estas cualidades hacen que su ingestión sea recomendada en regímenes dietéticos, ya que según recientes estudios tiene la cualidad de retirar radicales libres actuando como protector anticancerígeno. A todo esto hay que añadir su atractivo color y su sabor exótico.

Los objetivos principales en el presente trabajo de investigación fueron:

- * Determinar la evolución de los índices de calidad y madurez de frutos de papaya hermafrodita y hembra durante su conservación frigorífica.
- * Conocer la aptitud de los frutos de papaya hembra (no comerciales) al procesado por congelación.
- * Establecer la relación entre los enzimas oxidativos (peroxidasa y polifenoloxidasas) y las modificaciones de la calidad del producto congelado y conservado durante tiempos prolongados.

Como objetivos secundarios se plantearon:

- * Caracterizar los enzimas peroxidasa y polifenoloxidasas en frutos de papaya hermafrodita y hembra, durante su conservación en fresco, así como el posible efecto que el proceso de congelación y conservación en estado congelado origina sobre las mismas.
- * Identificar los compuestos carotenoides de papaya hermafrodita y hembra responsables de su color y que forman parte importante del valor nutricional de estos frutos, estableciendo su evolución durante la maduración y los efectos del proceso de congelación.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. MATERIAL VEGETAL.

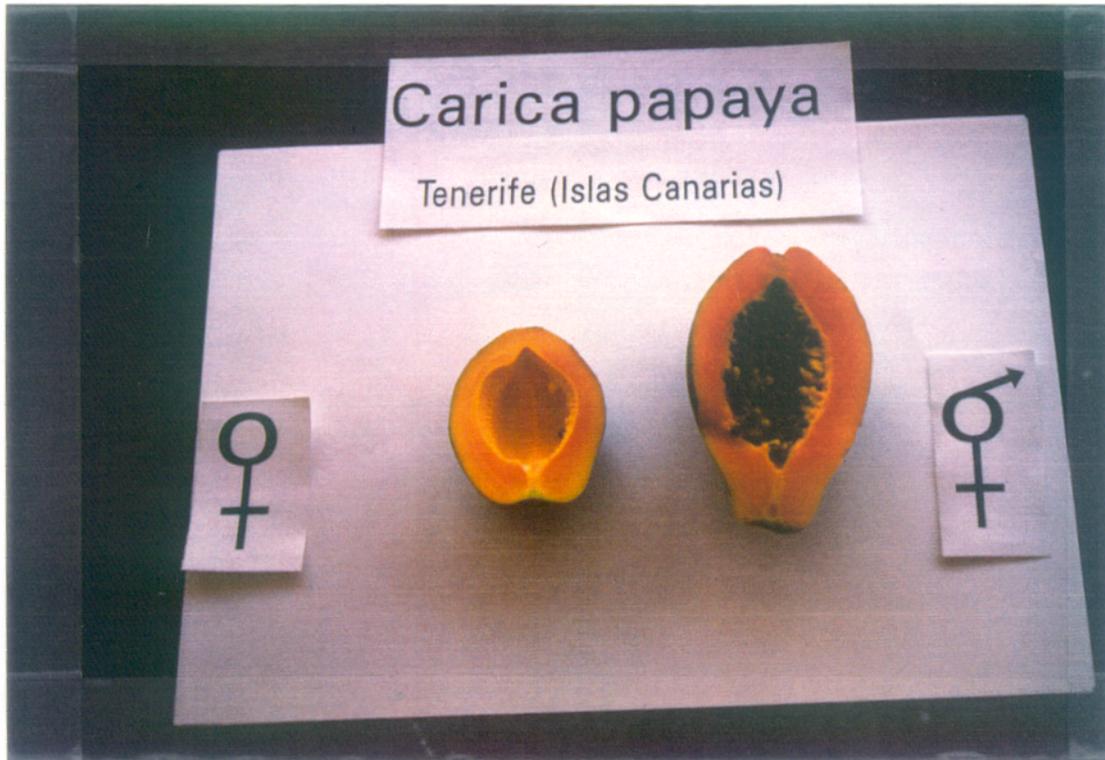
El material vegetal utilizado en este estudio, estaba constituido por frutos de Papaya (*Carica papaya*), cultivar Sunrise grupo Solo, procedentes de Tenerife, Islas Canarias.

Estos frutos fueron recolectados manualmente de plantas hembras y hermafroditas una vez alcanzada su madurez fisiológica.

Como se aprecia en la Fotografía 6, los frutos hembras se caracterizan por ser redondeados y más pequeños que los hermafroditas. En las muestras utilizadas en el presente trabajo de investigación, el peso medio de los frutos hembras fue 203,27 g mientras que el de los hermafroditas alcanzó los 450,13 g.

La piel de ambos frutos era fina de color anaranjado con zonas verdes y amarillas. La pulpa era de color naranja siendo más brillante la del fruto hermafrodita.

Cuando se corta el fruto longitudinalmente, se observa que la cavidad central del fruto hembra es hueca, con pocas semillas en su interior. Sin embargo, la cavidad central del fruto hermafrodita está cubierta casi en su totalidad por semillas que son de mayor tamaño y color negrozco, Fotografía 6.



Fotografía 6: Frutos de papaya hermafrodita y hembra seccionados longitudinalmente.

*** Procedencia de los frutos.**

Los frutos utilizados en las dos campañas, 1993/1994 y 1994/1995, procedían de la misma plantación (invernadero), según se muestra en la Fotografía 7, sita en el término municipal de Las Gallétas, al sur de la Isla de Tenerife (Islas Canarias).



Las técnicas de post-recolección previas a la conservación frigorífica de los frutos consistieron en el transporte, selección y acondicionamiento en los envases de ensayo.

* Recolección y transporte.

La recolección practicada en las dos campañas 1993/1994 y 1994/1995 se realizó de forma manual y en una única fecha; 10 Julio 1993 y 15 Julio 1994.

El transporte se realizó en avión, para evitar el calentamiento excesivo de los frutos, no excediendo de 10 a 12 horas el intervalo de tiempo desde la recolección y la recepción de los mismos en los Laboratorios de Madrid.

* Selección y acondicionamiento.

Una vez recibidos los frutos en los Laboratorios del Instituto del Frío, en Madrid, se procedió a su manipulación para su selección y acondicionamiento.

La selección se realizó atendiendo a sus características externas: grado de desarrollo y madurez, calibre, color, manchas, deformaciones, heridas y estado sanitario.

Las cajas que constituían cada lote de ensayo, hembras y hermafroditas, se estibarón en la cámara frigorífica descrita en el apartado 3.2.

3.2. CONSERVACION EN ESTADO REFRIGERADO.

* Condiciones frigoríficas de conservación.

El tratamiento frigorífico de los frutos se llevó a cabo en una cámara del Instituto del Frío a una temperatura de 14°C y una humedad relativa de 90-95%. Estas condiciones de conservación se encuentra entre las recomendadas por Salunkhe (1984) para el almacenamiento frigorífico de estos frutos.

El sistema de enfriamiento es el de transmisión indirecta, actuando como fluido frigorífero una solución incongelable de agua glicolada. La circulación del aire de dichas cámaras de 12,5 m³ se realiza por convección

forzada mediante ventiladores incorporados en la batería de enfriamiento, capaces de proporcionar un coeficiente de recirculación comprendido entre 25 y 30.

* Composición de las muestras de frutos para el análisis de los índices de calidad y madurez.

Para la determinación de los análisis iniciales se separaron aleatoriamente diez frutos de entre los seleccionados para los ensayos.

En los análisis periódicos realizados durante el transcurso de la conservación frigorífica, se procedió de igual forma dentro de cada lote.

Las características iniciales de los frutos figuran en la Tabla IV (página 51).

3.3. PROCESADO DE LOS FRUTOS.

Una vez alcanzado el grado de madurez idóneo para su congelación, los frutos fueron lavados, secados y pelados. Las pulpas, se seccionaron longitudinalmente eliminándose las semillas. Posteriormente, los medios frutos, fueron cortados en rodajas de un tamaño uniforme (aproximadamente 50 x 35 x 15mm), prescindiéndose de aquellas zonas en las que no fue posible obtener rodajas de un tamaño homogéneo.

PARAMETROS		HERMAFRODITA	HEMERA
PARAMETROS FISICOS			
FIRMEZA (N/g)		1,66	1,40
COLOR	L	32,96	34,12
	a	10,11	9,19
	b	19,53	20,00
PARAMETROS FISICO-QUIMICOS			
pH		6,41	6,17
ACIDEZ TOTAL ¹		0,10	0,09
SOLIDOS SOLUBLES (°Brix)		12,80	12,03
SOLIDOS TOTALES (%)		14,0383	15,9499
CONTENIDO EN AGUA (%)		85,9617	84,0502
PARAMETROS QUIMICOS			
CAROTENOS ²		12,18	10,26
PECTINAS (g/100 g prod,)		0,34	0,66
PARAMETROS BIOQUIMICOS			
PROTEINAS EXTRAIDAS		13,75	12,85
ACTIVIDAD POD ³		141,75	144,41
ACTIVIDAD PPO ³		126,51	109,62
ACTIVIDAD POD ESPECIFICA ⁴		10,31	11,24
ACTIVIDAD PPO ESPECIFICA ⁴		4,81	8,53

¹ (g ac. cítrico/100 g de producto)

² (µg/g producto expresado en equivalentes de β-caroteno)

³ (ΔDO/min/g producto)

⁴ (ΔDO/min/mg proteína)

Tabla IV: Características iniciales de los frutos de papaya hermafrodita y hembra antes de ser sometida al proceso de congelación.

El envasado se realizó, a vacío, en una envasadora Multivac Geprüfte Sicherheit, en bolsas Polyskin X, de 12 micras de espesor, polímero plástico complejo compuesto de una película de poliéster saranizado por una cara y por la otra de polietileno. Este polímero se caracteriza por su elevada barrera al oxígeno, gran termosoldabilidad y brillo excelente, además la mejora del poder de retracción biaxial aseguraba el efecto "segunda piel" en el producto.

Entre sus propiedades destacan:

- Permeabilidad al vapor de agua: 3,5 g/m²/24h a un 90% de H.R.
- Permeabilidad al oxígeno: 5-6 cm³/m²/24h/atm. a un 85% de H.R.
- Permeabilidad al anhídrido carbónico: 100 cm³/m²/24h/atm. a un 85% de H.R.

Las bolsas tenían un tamaño de 30 x 20 cm y en cada una de ellas se introducía un peso aproximado de 250 g de producto.

A continuación, se congelaron en un túnel semi-experimental de aire forzado de Frigoescandia, con una velocidad de aire de 5,7 m/s a $-40 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 25 minutos aproximadamente, tiempo suficiente para que el centro térmico de las rodajas de papaya alcanzara una temperatura de -24°C , Fotografía 8.



Fotografía 8: Rodajas de papaya a la salida del túnel de congelación.

Las curvas de congelación se registraron en un registrador Yokogawa Electrofact modelo 3088 Hybrid Recorder, resultando análogas a la representada en la Figura 1.

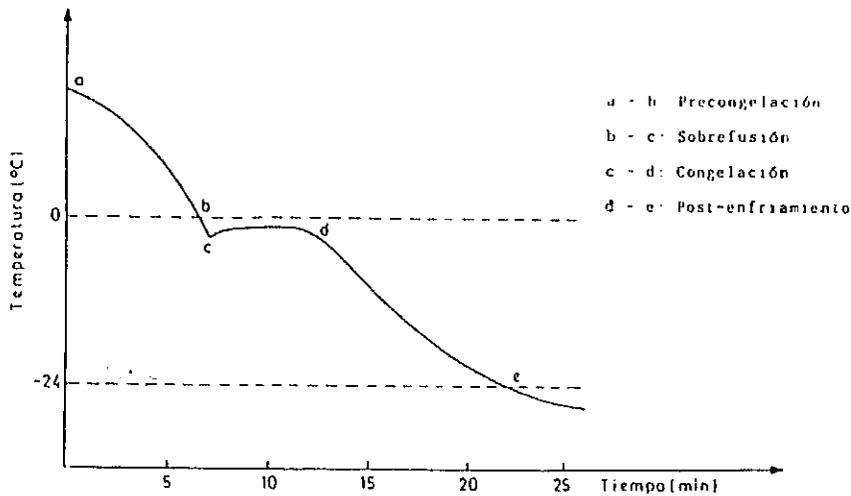


Figura 1: Curva de congelación.

3.4. CONSERVACION FRIGORIFICA EN ESTADO CONGELADO.

Las muestras congeladas y convenientemente etiquetadas, fueron almacenadas en un arcón congelador a una temperatura de -24°C . Esta temperatura es la recomendada por el Instituto Internacional del Frío (1986) para la conservación en estado congelado de ciertos frutos.

3.5. PREPARACION DE LAS MUESTRAS OBJETO DE ANALISIS.

3.5.1. DESCONGELACION.

La descongelación de las muestras se realizó colocando las bolsas de

producto congelado, sin abrir, en una cámara frigorífica a 4-5°C durante 2 horas, cubriéndolas para preservarlas de la luz.

3.5.2. OBTENCION Y CONSERVACION DE PRODUCTO LIOFILIZADO.

El fruto congelado en rodajas, se liofilizó mediante la utilización de un equipo Telstar s.a. modelo Lioalfa. El tiempo necesario para una liofilización completa fue de 48 horas. Las muestras liofilizadas se almacenaron en un arcón frigorífico a -24°C, para el posterior análisis de ciertos constituyentes (pectinas, proteínas, peroxidasa, polifenoloxidasa...).

3.5.3. CONGELACION CON NITROGENO LIQUIDO Y ALMACENAMIENTO A -80°C.

Para la realización de los análisis bioquímicos se realizó una congelación casi instantánea con nitrógeno líquido para asegurar la estabilidad de estos parámetros. La congelación de las muestras se realizó por inmersión, almacenándose en recipientes adecuados en un arcón congelador a -80°C.

3.6. DETERMINACIONES ANALITICAS.

Durante la conservación de los frutos tanto frescos como procesados, se llevaron a cabo las determinaciones analíticas, que en algunos casos (e.j.

firmeza) diferían en su metodología, como se describe a continuación.

3.6.1. PARAMETROS FISICOS.

3.6.1.1. FIRMEZA.

Para el control objetivo de la firmeza en los diferentes grados de madurez, frutos frescos, se realizaron ensayos de penetración con un penetrómetro Effe-gi, provisto de un punzón de 11 mm de diámetro y 10 mm de longitud de penetración. Los resultados obtenidos se expresaron en N.

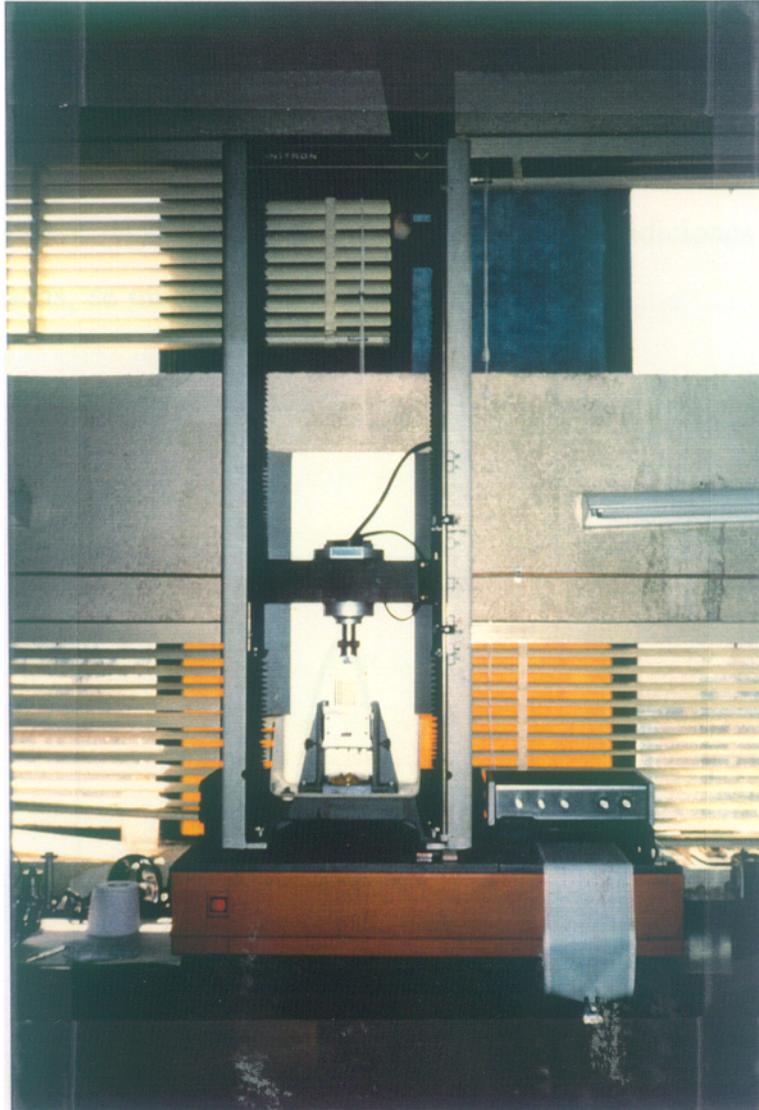
Para determinar la firmeza de los trozos congelados-descongelados, se empleó un Instron Food Testing Instrument, modelo 1140, que consta fundamentalmente de los siguientes componentes:

- un mecanismo para deformar la muestra de manera controlada.
- un sistema de registro de la fuerza, el tiempo y la deformación.
- una célula de ensayo en la que se coloca y deforma la muestra.

La medida de la firmeza se realizó tras adaptar a la célula de carga, una célula desarrollada por Kramer y col. (1951), Fotografía 9. Esta célula combina extrusión, compresión y fuerza de corte, de forma que se simula la masticación. La altura máxima de la curva obtenida, Figura 2, puede ser considerada como medida de la resistencia a la cizalladura (Touraille y Sale, 1977).

Se colocó un peso aproximado de 50 g de papaya en rodajas de espesor

uniforme, en el fondo de la célula de Kramer, de manera que formaran una superficie homogénea, realizándose el ensayo a continuación.



Fotografía 9: Instron Food Testing Instrument, modelo 1140 con la célula de Kramer adaptada.

Los parámetros de medida empleados fueron:

- Velocidad del cabezal: 400 mm/min.
- Velocidad de la carta de registro: 100 mm/min.

- Célula de carga: 5-50 Kg.
- Rango: 50 Kg.

Los resultados obtenidos se expresaron en N/g de producto fresco.

La curva representativa de la medida objetiva de la firmeza registrada por el Instron Food Testing Instrument, bajo las condiciones anteriormente mencionadas, se muestra en la Figura 2.

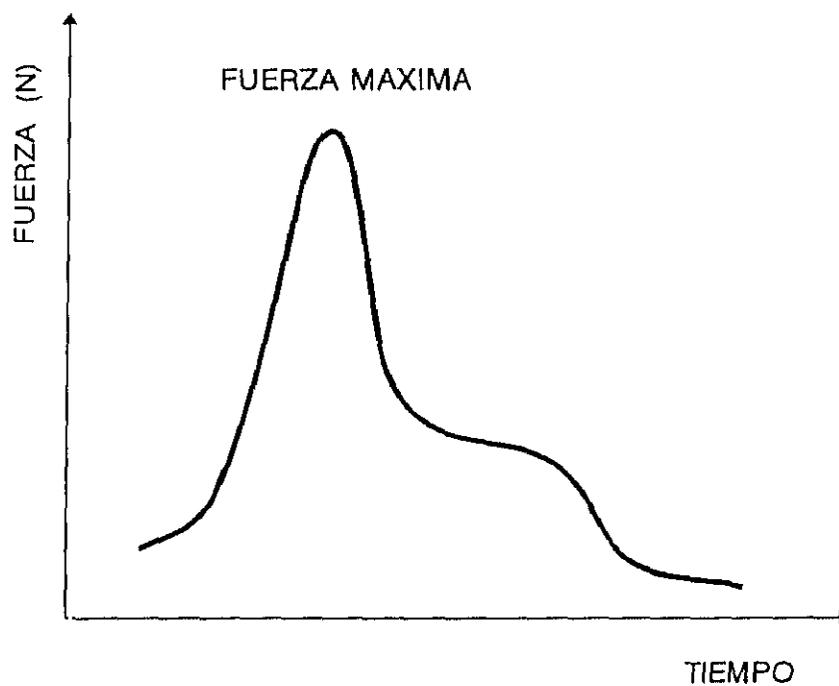


Figura 2: Curva representativa de la medida objetiva de firmeza.

3.6.1.2. COLOR.

La medida objetiva de color de la pulpa de papaya homogeneizada se realizó en un colorímetro diferencial Hunterlab Tristimulus Colorimeter, modelo D 25 A-9, con reductor, que se calibraba previamente con una placa negra con la que se hacía el cero y otra de referencia de color blanco ($X=82,51$, $Y=84,53$, $Z=101,23$), a la que se adjudicó el valor máximo de luminosidad. La pulpa homogeneizada se introdujo en una cápsula de plástico, de 5 cm de diámetro x 2 cm de altura.

Los resultados obtenidos se expresaron con las coordenadas, L (luminosidad), a (tonalidad verde-rojo) y b (tonalidad azul-amarillo). De estos valores derivan las funciones Hue (h), coeficiente de saturación (C) y diferencia de color total (ΔE), siendo: $h = \arctan(b/a)$; $C = [(a^2 + b^2)]^{1/2}$ y $\Delta E = [(L_1 - L_2)^2 + (a_1 - a_2)^2 + (b_1 - b_2)^2]^{1/2}$.

3.6.1.3. EXUDADO.

El volumen de exudado liberado por gramo de peso fresco se determinó dejando descongelar una cantidad conocida de muestra en una cámara frigorífica a 4-5°C durante dos horas, midiéndose posteriormente el volumen de líquido secretado por el producto.

Se expresa como ml/100 g de producto.

3.6.2. PARAMETROS FISICO-QUIMICOS.

3.6.2.1. pH.

El pH de las diferentes muestras se determinó con un pH-metro CG-837 Schott Geräte, combinado con un electrodo de pH N1042A con sensor de temperatura integrado. Un peso aproximado de 10 g de producto en pulpa se homogeneizaron con 20 ml de agua destilada. La mezcla se calentó hasta ebullición. A continuación se añadieron otros 20 ml de agua destilada al homogeneizado y una vez enfriado a 20°C se midió el pH.

3.6.2.2. ACIDEZ TITULABLE.

La acidez titulable se determinó por neutralización con NaOH 0,1N, del homogeneizado del apartado anterior. Se consideró finalizada la valoración cuando el valor del pH, alcanzó 8,1. Para hacer más cómoda y rápida la determinación se utilizó una bureta automática Metler DV 250.

Los resultados se expresaron como mg de ácido Cítrico/100 g producto.

3.6.2.3. SOLIDOS SOLUBLES.

Los sólidos solubles, expresados como extracto refractométrico en grados Brix (°Brix) a 20°C, se midieron en las pulpas homogeneizadas, empleando un refractómetro digital Atago dbx-30 con corrección automática de temperatura.

El resultado se expresó como extracto refractométrico en °Brix a 20°C.

3.6.2.4. SÓLIDOS TOTALES Y CONTENIDO EN AGUA.

La determinación de los sólidos totales se realizó según el método n° 22018 de la AOAC (1990), modificado mediante el empleo de un horno microondas Toshiba ER-6860 sw, a 200 w de potencia durante 30 minutos.

El resultado se expresa en gramos de residuo seco por 100 g de peso fresco.

El contenido en agua del producto se calculó a partir del valor obtenido para los sólidos totales y se expresa en g de agua por 100 g de peso de producto fresco.

3.6.3. PARAMETROS QUÍMICOS.

3.6.3.1. CAROTENOIDES.

La separación, identificación y cuantificación de los compuestos carotenoides, se realizó por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (CLAE).

*** Extracción.**

La extracción de las muestras se realizó según un método modificado

de Bushway y Wilson, (1982).

Para realizar los análisis, los frutos se lavaron, pelaron y después de eliminar las semillas, se trocearon.

A 30 g de muestra (mezcla de un troceado de varios frutos), se añadieron sulfato sódico y carbonato magnésico (200% y 10% del peso de la muestra, respectivamente) y 100 ml de tetrahidrofurano (THF) estabilizado con hidroxitolueno butilado (BHT) (0,01 %). La mezcla se homogeneizó en un Omni-mixer con baño exterior de hielo, en total oscuridad y en atmósfera de nitrógeno, para impedir la degradación y las isomerizaciones *cis-trans*. El extracto se filtró a vacío con papel Whatman nº2 lavando varias veces con, THF, hasta que el residuo quedó sin color. A continuación, el filtrado se concentró en un rotavapor a 35°C, hasta 10 ml, y posteriormente se añadieron 50 ml de una solución de diclorometano-agua a partes iguales. La fase orgánica se separó mediante embudo de decantación lavándose varias veces con agua (salmuera 3 x 50 ml). Las aguas de lavado, se unieron y se extrajeron con diclorometano (3 x 50 ml), hasta que la fase acuosa quedó incolora. Las fases orgánicas, se reunieron y se secaron con sulfato sódico anhidro. Después de filtrar las sales, y antes de evaporar la fase orgánica hasta sequedad, se añadieron al extracto entre 0,05 a 0,07 mg de patrón interno, Sudán I (1-fenilazo-2-naftol). El residuo así obtenido se redisuelve en diclorometano para CLAE (0,3 ml) y se inyecta directamente en el cromatógrafo (20µl).

* Saponificación.

La saponificación se realizó con 50 ml del extracto en diclorometano y 1,4 ml de hidróxido potásico en metanol al 30% bajo atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente durante 6 horas. La solución se introdujo en un embudo de decantación añadiendo éter y una solución acuosa saturada de cloruro sódico, quedando separada la fase orgánica. La fase acuosa, se extrajo con éter y las fases orgánicas se reunieron, lavándose varias veces con agua hasta que se eliminó por completo el hidróxido potásico, (pH 7,0). La fase etérea se secó (Na_2SO_4), se filtró, se eliminó a vacío, y el residuo se disolvió en el solvente apropiado para el análisis cromatográfico (CLAE).

* Equipo de cromatografía.

Se utilizó un Cromatógrafo de Líquidos de Alta Eficacia de Hewlett-Packard modelo 1050 con un sistema cuaternario de entrada de disolventes, equipado con un detector de UV/VIS de diodos modelo Hewlett-Packard 1040A.

- Los datos obtenidos se almacenaron y procesaron en un ordenador Hewlett-Packard 9000/300.
- Las separaciones se realizaron con dos columnas en serie de acero inoxidable de Hewlett-Packard (10 cm x 4,6 mm i.d.) Hypersil ODS (partículas esféricas de 5μ), protegido con un cartucho Hibar (3 cm de largo x 4,6 mm i.d.) empaquetado con Sherishorp- C_{18} (5μ de tamaño de partícula).

- La separación analítica se realizó de acuerdo con el procedimiento empleado por Cano (1991), con pequeñas modificaciones.

Se utilizó un gradiente realizado con Metanol/agua (75:25) como eluyente A y acetato de etilo como eluyente B, empezando a tiempo 0 hasta tiempo 10 minutos, con una composición semifinal del eluyente B del 70%. La composición del disolvente en gradiente se sigue desde tiempo 10 minutos hasta 20 minutos con una composición final del eluyente B del 100%. La velocidad del flujo empleada fue de 1 ml/min, y el barrido cromatográfico se monitorizó a 450 nm. Al final del gradiente la columna se reequilibró hasta conseguir las condiciones iniciales con un nuevo gradiente desde tiempo 20 hasta tiempo 30 minutos, con una composición final de eluyente B del 100% y con la misma velocidad de flujo (1 ml/min).

* Separación e identificación.

Las xantofilas se separaron e identificaron según el procedimiento descrito por Cano (1991) y Cano y Marín (1992) en kiwi. Los extractos se separaron por cromatografía sobre placa semipreparativa (20 x 20 cm, 200 μ m de espesor: gel de sílice 60F 254 Merk, Darmstadt, W. Germany) bajo una corriente continua de nitrógeno utilizando una solución que contenía éter de petróleo y acetona al 50%. Las placas se introdujeron en el solvente y se dejaron evolucionar durante una hora y media en oscuridad y a temperatura ambiente. Las bandas se raspan de la placa y se extraen en el solvente adecuado para la posterior purificación en CLAE.

El procedimiento que se utilizó para la separación e identificación de

los compuestos carotenoides fue la Cromatografía Líquida de Alta Eficacia en fase reversa. El sistema operativo Hewlett-Packard 9000/300 nos permitió analizar la pureza de los picos por su espectro de absorción en UV/Visible.

Los carotenoides se identificaron por comparación de los tiempos de retención en CLAE y los máximos de absorción en UV/VIS de carotenos comerciales o previamente aislados de otros frutos Cano (1991), con los separados en los extractos de papaya. Asimismo, el espectro máximo de cada pico se comparó con aquellos encontrados en la literatura Köst (1988). Algunos grupos funcionales presentes en las estructuras de los carotenos se identificaron mediante reacciones químicas específicas: conversión del 5,6-epóxido en 5,8-furano en medio ácido, acetilación de grupos hidroxilo libres y reducción de grupos cetona con borohidruro sódico, (Davies, 1976 y Liaen-Jensen, 1971).

* Cuantificación.

El análisis cuantitativo por CLAE se realizó utilizando sudán I como patrón interno. Los análisis se realizaron por duplicado inmediatamente después de la extracción para evitar degradaciones e isomerizaciones. Cada uno de los picos separados fueron cuantificados como equivalentes de β -caroteno. Para la cuantificación se utilizó el área de los picos registrados a 450 nm.

La cuantificación se realizó calculando el factor de respuesta (f_r) del β -caroteno con respecto al patrón interno (sudán I).

Se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Peso X / Peso P.I.} = f_x \text{ área X / área P.I.}$$

P.I. Patrón interno (sudán I).

X β -caroteno.

f_x Factor respuesta.

En estos ensayos se empleó sudán I como patrón interno en lugar del β -apo-8 α -carotenal que es el patrón utilizado con más frecuencia, debido a que interfería menos en la separación.

3.6.3.2. ACIDOS ORGANICOS.

Para la determinación de los ácidos orgánicos mayoritarios (ácidos Oxálico, Cítrico, Galacturónico, L-Málico, Quínico, Succínico y Fumárico) se empleó la Cromatografía Líquida de Alta Eficacia, según describe Cano y col., (1994).

* Preparación de las muestras.

10 g de pulpa de papaya se homogeneizaron en un Omnimixer con 50 ml de metanol, calentándose a continuación la mezcla a reflujo durante 15 minutos. Una vez enfriado el homogeneizado, se filtra a vacío y el extracto metanólico resultante se evapora a sequedad en un rotavapor. El residuo obtenido se redisuelve en 50 ml de agua desionizada, y se pasa a través de una columna SEP-PACK C₁₈ previamente activada con metanol y agua, y posteriormente a través de un filtro Millipore AH de 0,45 μm . El extracto así preparado se inyectó directamente en el cromatógrafo.

* Equipo de cromatografía.

El equipo empleado fue un cromatógrafo Hewlett-Packard, modelo 1040, compuesto por los siguientes módulos:

- Bomba-inyector Hewlett Packard 1050.
- Detector UV/Visible de diodos Hewllett Packard 1040A.
- Ordenador Hewlett Packard 9000/300 donde se almacenan y procesan datos.
- Columna Ion-300 de Interaction, de acero inoxidable de 300 mm de largo y

6,5 mm de diámetro interno.

- Horno termostatzado CROCO-CII

* Condiciones cromatográficas.

- Fase móvil: Solución de ácido sulfúrico 0,0085 N en agua desionizada, pasada a través de un filtro Millipore AH 0,45 μm y degasificada en un baño de ultrasonido.

- Volumen inyectado: 20 μl tanto de muestra como de patrón.

- Flujo: 0,400 ml/min.

- Temperatura de la columna: 42°C obtenidos con un horno de termostatzación.

* Cuantificación de las muestras.

La cuantificación de los picos se llevó a cabo mediante comparación de áreas, por el método de patrón externo, una vez identificados los ácidos orgánicos presentes en las muestras.

3.6.3.3. PECTINAS TOTALES.

La determinación de las pectinas totales en las diferentes muestras, se realizó según Shacklady (1969).

*** Extracción.**

A 1 g de producto liofilizado se añadió 40 ml de etanol de 96°, introduciéndose posteriormente en un baño a 85°C durante 10 minutos y agitando la mezcla con una varilla de vidrio. Una vez enfriada la mezcla, se centrifugó a 5000 r.p.m. durante 15 minutos. Posteriormente, sobre el precipitado, libre del sobrenadante, se añadieron 40 ml de etanol al 80%, y se volvió a continuación a calentar a 85°C, dejando enfriar y centrifugando. Este proceso se repitió otras dos veces más.

El precipitado obtenido se resuspendió en agua destilada y se introdujo en un matraz aforado que contenía 5 ml de NaOH 1 N, aforando a 100 ml con agua. Se agitó, se dejó reposar 10 minutos y se filtró por gasa. (solución A).

* Determinación colorimétrica.

Para la determinación colorimétrica fue preciso diluir la solución A al 10%.

Se realizó una recta de calibrado con una solución patrón de ácido galacturónico monohidratado y un blanco para poder cuantificar las pectinas totales. La solución patrón se realizó pesando 120,5 g del ácido galacturónico monohidratado (secado durante 5 horas a vacío a 30°C) añadiendo 0,5 ml de NaOH 1 N y aforando a 1 l con agua destilada. Una vez agitada la solución y después de estar en reposo toda la noche, la concentración de dicha solución era de 100 μg de ácido galacturónico anhidro (AGA)/ml.

Se hicieron disoluciones de la solución patrón de forma que teníamos puntos cuya concentración oscilaba entre 10 y 70 mg de AGA/ml. Para realizar la colorimetría se introdujeron en tubos de ensayo 0,5 ml de cada uno de estos matraces, así como de la muestra (solución A), 0,1 ml de carbazol al 0,1% y 3 ml de ácido sulfúrico concentrado. Para el blanco se sustituyó el carbazol por etanol absoluto. A continuación se calentaron en un baño a 85°C durante 5 minutos. Una vez enfriados se leyeron las absorbancias en un espectrofotómetro, Perkin Elmer modelo Lambda 15, a 525nm.

El resultado se expresa como g de pectinas totales/100 g de producto liofilizado.

3.6.4. PARAMETROS BIOQUIMICOS.

3.6.4.1. OBTENCION DEL EXTRACTO ENZIMATICO.

En un Omni-mixer Sorvall 17106 con baño exterior de hielo se homogeneizaron 0,5 g del producto liofilizado con 20 ml de tampón fosfato 0,2 M pH 7,0 que contenía un 1% de polivinilpolipirrolidona (PVP o PVP insoluble). El tiempo necesario fue de 3 minutos, a intervalos de 1 minuto de homogeneización y 1 minuto de reposo.

Posteriormente las muestras se centrifugaron en una centrífuga frigorífica, Sorvall RC-5B refrigerated superspeed centrifuge, a 18000 r.p.m. durante 30 minutos a 4°C.

El sobrenadante se filtró por gasa, determinando su volumen y se utilizó posteriormente para la determinación de proteínas, y actividades enzimáticas.

Para la elección del tampón de extracción y de lectura se ensayaron distintos pH, distinta fuerza iónica, distintas sales, presencia o no de Triton X-100...

3.6.4.2. DETERMINACION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS.

Las actividades enzimáticas de Peroxidasa (POD) y Polifenoloxidasa (PPO), se determinaron midiendo a 25 °C, las unidades por minuto y por gramo de producto, a una longitud de onda de 485 y 420 nm respectivamente, en un Espectrofotómetro UV-Vis Perkin Elmer modelo Lambda 15, de las mezclas de reacción que se describen a continuación.

3.6.4.2.1. Actividad Peroxidasa.

En una cubeta de plástico se mezclaron: 2,7 ml de Tampón fosfato 0,05 M pH 6,5, 100 µl de Peróxido de Hidrógeno al 1,5% (v/v) y 200 µl de Parafenilendiamina al 1% (p/v) adicionándose 25 µl del extracto enzimático con lo que dio comienzo la reacción. Se determinaron las diferencias de absorbancia a 485 nm que se producen a lo largo del tiempo.

3.6.4.2.2. Actividad Polifenoloxidasa.

Se utilizó como mezcla de reacción para determinar la actividad polifenoloxidasa: 1,5 ml de Catecol 0,1 M en tampón fosfato 0,05 M pH 6,5, 1,5 ml de tampón fosfato 0,05 M pH 6,5 con 25 μ l del extracto enzimático. Las diferencias de absorbancia se determinaron a 420 nm.

Tanto los resultados de la actividad de Peroxidasa como de la actividad polifenoloxidasa se expresan como Δ DO/min/g de producto o bien como Δ DO/min/mg de proteína.

3.6.4.3. DETERMINACION DE LAS PROTEINAS EXTRAIDAS.

Para determinar la concentración de proteínas se siguió el Método colorimétrico desarrollado por Bradford (1976).

Al tiempo que se realizó la medida del contenido proteico en el extracto enzimático, se elaboró una recta patrón con seroalbúmina bovina (BSA). En la gráfica que se obtuvo representando la absorbancia a 595 nm frente a las

concentraciones conocidas de BSA, se extrapolaron las absorbancias determinadas en el extracto enzimático.

3.6.4.4. ANALISIS ELECTROFORETICO EN GELES DE BISACRILAMIDA.

El extracto enzimático se obtuvo siguiendo el procedimiento del apartado 3.6.4.1. pero concentrando más la muestra. Se homogeneizaron 0,9 g de producto liofilizado con 1% de PVPP y 5 ml de tampón fosfato 0,2 M pH 7,0. El objetivo de esta determinación fue conocer el patrón isoenzimático de la Peroxidasa y de la Polifenoloxidasas, así como su patrón proteico.

Para realizar esta técnica se recurrió a la utilización de un sistema de electroforesis, Miniprotean II dual slab cell de BIO-RAD, que consta de unas células pequeñas (10 x 8,5 cm) donde se ubican los cristales con un separador de (0,75 mm) y de una fuente de energía, Constant Voltage Power modelo 1000/500 de BIO-RAD.

Se utilizaron geles de bisacrilamida al 10% realizándose según Laemmli (1970) pero en condiciones nativas (sin SDS).

3.6.4.4.1. Preparación de los geles de bisacrilamida.

* Gel de separación.

Este gel se preparó a partir de las siguientes soluciones Stock conservadas a 4°C en ausencia de luz.

(a) Bisacrilamida (30% T, 2,67% C) que está formada por:

Acrilamida 30% (p/v) + N,N bismetilenacrilamida 0,8% (p/v). Esta solución sólo es válida 1 mes.

(b) Tampón Tris-ClH 1,5 M pH 8,8.

(c) Tampón Tris-ClH 0,5 M pH 6,8.

(d) TEMED.

(e) Persulfato amónico 10% (p/v). Esta solución es la más lábil pudiendo ser utilizada durante 1 semana, como máximo.

En un matraz se mezclaron: 3,3 ml de la solución (a), 2,5 ml de la (b) y 4 ml de agua y se degasificó en ultrasonido durante 10 minutos. A continuación, se añadieron 50 μ l de la solución (e) y 8 μ l de (d). Una vez preparados los cristales con un separador de 0,75 mm se introdujo esta mezcla entre los cristales, utilizando una pipeta pasteur. Posteriormente se añade una

mezcla isobutanol/agua al 50% que pasados 45 minutos hay que retirar para evitar que el gel se deshidrate.

* Gel de carga.

En un matraz se mezclaron: 1,3 ml de la solución (a), 2,5 ml de la (c) y 6,1 ml de agua, degasificándose durante 10 minutos en ultrasonido. A continuación, se añadió 50 μ l de la solución (e) y 10 μ l de la (d). Posteriormente se eliminó la solución de isobutanol/agua que preservaba el gel y se lavó con agua. Se introdujo la solución del matraz entre los pocillos que deja el peine colocado sobre los cristales con una inclinación de 10-15° evitando la formación de burbujas. En estos pocillos que tardan en formarse aproximadamente 45 minutos se introducen las muestras.

3.6.4.4.2. Preparación de las muestras.

Se preparó una solución concentrada 5 veces que contenía tampón Tris-CIH 0,5 M pH 6,8 al 50% (v/v), glicerol al 50% (v/v) y azul de bromofenol

al 1 % (p/v), Solución (g).

En los pocillos se aplicaron 30 μ l de una solución formada al mezclar 800 μ l del extracto enzimático obtenido en el apartado 3.6.4.4. con 200 μ l de la solución que contenía el bromofenol (solución (g)).

3.6.4.4.3. Desarrollo de la electroforesis.

El Tampón de electrodo consistía en una solución de Tris base 15 g/l que contenía glicina en una concentración de 72 g/l. De esta solución almacenada a 4°C se toman 60

ml y se lleva a 300 ml con agua destilada.

La electroforesis se desarrolló en una unidad de electroforesis Miniprotean de BIO-RAD, utilizando una fuente de energía en la que se fijaron las siguientes condiciones para dos geles: 400 V, 70 mA y 70 Watt.

La electroforesis se desarrolló en un cuarto termostaticado a 4°C, con una duración aproximada de 30 minutos.

3.6.4.4.4. Revelado de los geles.

3.6.4.4.4.1. Proteínas extraídas.

Los geles se sumergieron alrededor de 30 minutos en una solución que contenía Metanol 40% (v/v), ác. acético 10% (v/v) y Coomassie Brilliant Blue R-250 1% (p/v) utilizando un balancín, Rotaterm P. Selecta. A continuación, se introdujeron en una solución con la misma composición que la anterior a excepción del Coomassie Brilliant Blue R-250. Esta solución, lo que hace es desteñir el fondo del gel poniéndose de manifiesto las bandas proteicas.

3.6.4.4.4.2. Isoenzimas de Peroxidasa.

El gel se sumergió en una solución preparada con Tampón fosfato 0,05 M pH 6,5, peróxido de hidrógeno al 1,5% y orto-dianisidina al 1,0% en una proporción; 50 : 3,7 : 7,4, respectivamente.

A los 15 minutos aproximadamente, se pusieron de manifiesto las bandas que correspondían a los isoenzimas de Peroxidasa.

3.6.4.4.3. Isoenzimas de Polifenoloxidasas.

La solución en la que se sumergieron los geles para observar las bandas que corresponden a los isoenzimas de polifenoloxidasas, consistió en ácido gálico 0,003 M disuelto en Tampón Fosfato sódico 0,05 M pH 6,5.

A los 15 minutos aproximadamente, se manifestaron las diferentes bandas, correspondientes a los isoenzimas de Polifenoloxidasas. A continuación, se introdujo el gel en una solución de etanol para una mejor manifestación y conservación de las bandas en el tiempo.

3.6.4.4.5. Secado de geles.

Una vez que se destiñó en lo posible el fondo de los geles, se pusieron sobre papel de celofán y se secaron en un secador de geles, Gel Dryer modelo 543 de BIO-RAD.

3.7. ANALISIS SENSORIAL.

Se seleccionaron 10 panelistas que fueron previamente entrenados para evaluar el producto antes y después de realizar el proceso de congelación, así como durante la conservación en estado congelado.

3.7.1. PREPARACION DE LAS MUESTRAS. TIPOS.

Para que los catadores evaluaran las muestras sin tener conocimiento de si estaban o no congeladas, las rodajas de papaya que estaban congeladas, se descongelaron en una cámara a 4°C durante 2 horas.

Se realizaron dos tipos de catas:

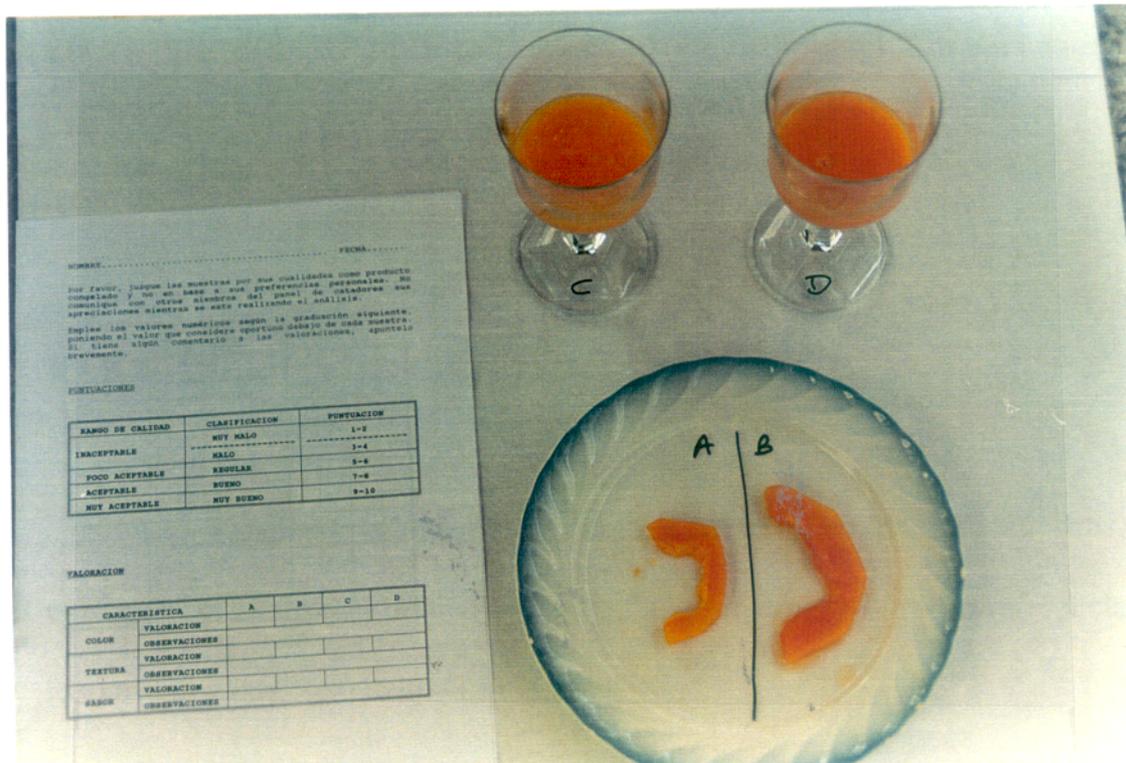
a) En rodajas de papaya. Las rodajas una vez descongeladas se colocaron de forma que el catador no conocía si procedían de frutos hermafroditas o de hembras.

b) Postres. Las rodajas de papaya descongeladas se homogeneizaron con zumos de naranja y limón y con azúcar. Para que no variara la formulación del postre, estos siempre se realizaron de la misma manera:

* Postre hermafrodita: 400 g de papaya hermafrodita + 150 ml de naranja + 50 ml de limón + 35 g de azúcar.

* Postre hembra: 320 g de papaya hembra + 125 ml de naranja + 40 ml de limón + 25 g de azúcar.

Además el catador no conocía si el postre se había elaborado a partir de rodajas hermafroditas o hembras, Fotografía 10.



Fotografía 10: Análisis sensorial.

3.7.2. PRUEBAS SENSORIALES.

Se ubicó a los panelistas en una sala de cata, de acuerdo con las especificaciones recogidas en la propuesta UNE (1976) n° 33119.

3.7.2.1. ACEPTABILIDAD-PREFERENCIA.

El panel de catadores valoró la aceptabilidad de las muestras de acuerdo a una escala continua de 1 (Inaceptable) a 10 (muy aceptable). Los parámetros a evaluar fueron la textura, el color y el sabor.

3.7.2.2. ANALISIS DESCRIPTIVO.

Los catadores realizaron un análisis descriptivo de las muestras, valorando la intensidad de textura, color, y sabor, tomando como referencia los atributos que figuraban en los formularios.

Los panelistas rellenaron los siguientes formularios.

NOMBRE..... FECHA.....

Por favor, juzgue las muestras por sus cualidades como producto congelado y no en base a sus preferencias personales. No comunique con otros miembros del panel de catadores sus apreciaciones mientras se este realizando el análisis.

Emplee los valores numéricos según la graduación siguiente, poniendo el valor que considere oportuno debajo de cada muestra. Si tiene algún comentario a las valoraciones, apunte brevemente.

PUNTUACIONES

RANGO DE CALIDAD	CLASIFICACION	PUNTUACION
INACEPTABLE	MUY MALO	1-2
	MALO	3-4
POCO ACEPTABLE	REGULAR	5-6
ACEPTABLE	BUENO	7-8
MUY ACEPTABLE	MUY BUENO	9-10

VALORACION

CARACTERISTICA		A	B	C	D
COLOR	VALORACION				
	OBSERVACIONES				
TEXTURA	VALORACION				
	OBSERVACIONES				
SABOR	VALORACION				
	OBSERVACIONES				

NOMBRE..... FECHA.....

Determine la intensidad de los atributos de cada muestra.

		A	B	C	D
C O L O R	5.- NARANJA/PARDO				
	4.- NARANJA				
	3.- NARANJA BRILLANTE				
	2.- NARANJA PALIDO				
	1.- AMARILLO				
		A	B	C	D
S A B O R	5.- MUY DULCE				
	4.- MENOS DULCE				
	3.- DULCE				
	2.- POCO DULCE				
	1.- INSIPIDO				
		A	B	C	D
T E X T U R A	5.-EXTREMADAMENTE FIRME				
	4.- MUY FIRME				
	3.- FIRME				
	2.- LIGERAMENTE FIRME				
	1.- BLANDO				

Observaciones: sabores extraños, otras características...

3.8. ANALISIS ESTADISTICO.

El tratamiento estadístico de los datos obtenidos a lo largo del presente trabajo de investigación, se realizó con los paquetes estadísticos, Statgraphics e Instat.

3.8.1. ANALISIS DESCRIPTIVO DE LA MUESTRA.

Una vez extraídos los estadísticos de cada variable, se comprobó el comportamiento normal de la distribución mediante los coeficientes de asimetría y Kurtosis. Las variables presentaron un comportamiento normal por lo que no fue necesario someterlas a transformaciones.

Este análisis descriptivo de la muestra se llevó a cabo mediante la utilización del programa Statgraphics.

3.8.2. ANALISIS DE VARIANZA.

Para determinar la existencia de diferencias significativas en los

distintos parámetros (físicos, fisico-químicos, químicos y bioquímicos), entre los sexos de papaya y los tiempos de maduración o conservación en estado congelado se planteó un modelo de análisis de varianza univariante (ANOVA), perteneciente al programa estadístico Instat. Para cada posible par, el contraste se resolvió mediante la utilización del test Bonferoni. El nivel de confianza se fijó en el 95 %.

3.8.3. T-test.

Para las valoraciones de aceptabilidad de las distintas muestras se planteó la utilización de un test no paramétrico, T-test para pares de muestras, perteneciente al programa estadístico Instat. El nivel de confianza se fijó en el 95 %.

3.8.4. ANALISIS DE FRECUENCIA.

Con los resultados obtenidos del análisis descriptivo de las muestras, se realizó un análisis comparativo de frecuencias entre las valoraciones obtenidas antes y después de realizar el proceso de congelación, así como

durante la conservación en estado congelado. Se planteó la hipótesis de la independencia para cada variable (atributo), que se resolvió mediante el contraste de ajuste Chi-cuadrado de Pearson.

Ante la dispersión observada en los datos fue necesario realizar un agrupamiento previo de los mismos, quedando de la siguiente manera:

- * Textura:
- 3. Firme
(5. Extremadamente firme y 4. Muy firme)
 - 2. Ligeramente firme
(3. Firme y 2. Ligeramente firme)
 - 1. Blando
(1. Blando)
- * Color:
- 3. Naranja pardo
(5. Naranja pardo)
 - 2. Naranja brillante
(4. Naranja y 3. Naranja brillante)
 - 1. Naranja pálido
(2. Naranja pálido y 1. amarillo)

- * Sabor:
- 3. Muy dulce
 - (5. Muy dulce y 4. Menos dulce)
 - 2. Dulce
 - (3. Dulce)
 - 1. Poco dulce
 - (2. Poco dulce y 1. Insípido)

ABRIR CAPÍTULO 4

