

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Materiales

6.1.1 Materia Prima

6.1.1.1 Enzima liofilizada

La enzima liofilizada polifenoloxidasasa Sigma (T3824). El frasco contiene 50,000 unidades de actividad y 12.8 mg (3906.25 unidades/mg).



Figura 3. Polifenoloxidasasa.

6.1.1.2 Manzanas

Se utilizó como materia prima manzana variedad Golden Delicious (*Malus sylvestris*) obtenidas en la Central de Abastos de la ciudad de Puebla.

6.1.2 Equipo

6.1.2.1 Homogenizador Duty Master A-C Motor

Las altas presiones dinámicas se aplicaron por medio del sistema homogenizador Duty Master A-C Motor (modelo 15MR-8TBA). Este cuenta con un sistema de homogenización continuo que aplica presiones de 0 a 100 MPa y se encuentra ubicado en la planta piloto del Departamento de Ingeniería Química y Alimentos de la Universidad de las Américas, Puebla.



Figura 4. Homogenizador Duty Master.

6.1.2.2 Homogenizador Hy Dive

Se estudió un sistema homogenizador de altas presiones y ruptura celular “Hy Dive” de Stansted Fluid Power Ltd modelo nG7400:350, ubicado en la planta piloto del departamento de Ingeniería Química y Alimentos en la Universidad de las Américas Puebla. El equipo es de acero inoxidable con requerimientos de energía de 3 kW y flujo máximo aproximado de 12 L/h presiones hasta de 400 MPa (Ver Apéndice N).



Figura 5. Equipo de altas presiones dinámicas Hy-Dive.

6.2 Métodos

6.2.1 Elaboración de sistemas modelo

Se prepararon sistemas modelo a diferentes niveles de pH (3.15, 3.6, 4, 4.5, 4.8 y 6). En agua destilada se adicionó ácido cítrico (0.1 N) para ajustar el pH de la solución y se agregó la polifenoloxidasa en una concentración constante de 0.1 mg ml^{-1} .

6.2.2 Elaboración de jugo de manzana

Se extrajo el jugo de manzana por medio del exprimidor marca Turmix y se pasó por un colador para disminuir el contenido de pulpa. Se prepararon 5L de jugo para cada corrida con un nivel de sólidos solubles entre 13 y 14°Bx.

6.2.3 Aplicación de tratamientos térmicos

El jugo recién preparado fue tratado térmicamente a 60 y 80°C en un baño de agua caliente, una vez que las temperaturas fueron alcanzadas después de 3 y 7.2 minutos

respectivamente, se tomaron muestras. Las muestras fueron enfriadas rápidamente para medirse la actividad enzimática residual.

Las muestras tomadas a 60°C son a 0,1, 2, 3, 5 y 15 minutos, en el caso del tratamiento a 80°C sólo se toman a 0, 1 y 5 minutos. A cada muestra se le determina la actividad enzimática residual.

6.2.4 Aplicación de altas presiones dinámicas en jugo de manzana

Una vez preparados los 5 L de jugo se colocaron dentro del equipo Duty Master. Se inició la circulación (1.0065 L/min) hasta alcanzar una presión de 100 MPa y se tomaron muestras después de 0, 5, 10, 20, 30 y 40 minutos. Las muestras se colocaron en bolsas para muestra estéril Nasco Whirl- Pack TM; en la salida de la manguera de recirculación adicionalmente se tomaba la temperatura del jugo (°C) y se cerraba la bolsa para evitar contaminación. Las corridas se hicieron por duplicado con temperatura inicial del jugo de 27 y 45°C.

6.2.5 Perfil de la temperatura en el tratamiento de altas presiones

El jugo recién extraído se trató térmicamente en un baño de agua, cuya temperatura se controló con un recirculador. Se simuló el mismo tiempo y cambio de temperatura ocurrido en los procesos de altas presiones dinámicas (6.2.4) y se evaluó el cambio de actividad enzimática.

6.2.6 Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron con un Análisis de Varianza (ANOVA) con un nivel de significancia del 95% ($P < 0.5$) con el programa Minitab.

6.2.7 Métodos de análisis

Los análisis que se realizaron fueron por triplicado.

6.2.7.1 Medición del pH

El pH de los sistemas modelos se determinó por inmersión directa del electrodo. El equipo usado fue el potenciómetro Conductronic, previamente calibrado con buffers de pH= 4 y pH=7.



Figura 6. Potenciómetro Conductronic.

6.2.7.2 Determinación de color

Los parámetros de color, luminosidad (L), y cromaticidad “a” (verde-rojo) y “b” (azul-amarillo), en escala de Hunter, fueron determinados usando el colorímetro Colorgard System en el modo de reflectancia; se usaron cajas Petri con 1.2 cm de profundidad y con un volumen constante de 15 ml. Para su calibración se usaron los mosaicos negro y blanco (L= -92.89, a=-1.05 y b=+0.82).

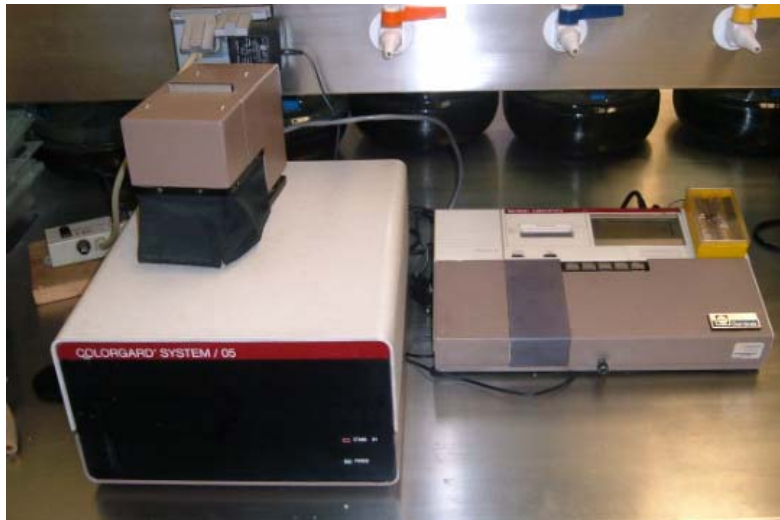


Figura 7. Colorímetro Color Gard System.

Posteriormente se evaluó el cambio neto de color entre las muestras siguiendo la ecuación.

$$\Delta E = \sqrt{(L_0 - L)^2 + (a_0 - a)^2 + (b_0 - b)^2}$$

Ec. 5

Donde:

- Lo luminosidad de referencia (condición inicial)
- L luminosidad de la muestra
- ao contribución de rojo- verde de referencia (condición inicial)
- a contribución de rojo- verde de muestra
- bo contribución de amarillo-azul de referencia (condición inicial)
- b contribución de amarillo-azul de muestra

6.2.7.3 Obtención del extracto enzimático

El extracto del jugo de manzana se obtuvo mezclando 10 ml de jugo de manzana con 10 ml de buffer McIlvaine (pH 6.6) (Ver Apéndice A para su preparación) y centrifugando a 5000 rpm durante 10 minutos en la centrifuga marca MARATHON 21 K/R FISHER SCIENTIFIC a una temperatura de 2°C. La fase acuosa se filtró posteriormente con papel Whatman No 4.



Figura 8. Centrifuga Maratón 21K/R.

6.2.7.4 Determinación de la actividad enzimática

Las unidades de actividad enzimática de polifenoloxidasas se determinaron espectrofotométricamente a 420 nm y 25°C utilizando el espectrofotómetro Shimadzu UV-160 aplicando el método de Pizzocaro y colaboradores (1993).

En una celda se colocaron 0.5 ml de extracto enzimático, 1ml de solución 0.175 M de catecol y 2ml de buffer Mc Ilvaine pH 6.6 (ver Apéndice A para la elaboración del buffer). Se usó una celda de referencia con soluciones iguales a la anterior pero que contiene 0.5 ml agua en lugar de extracto enzimático. Se midió la absorbancia durante 3 minutos.

Se registró el cambio en absorbancia con respecto al tiempo. Una unidad enzimática se define como $0.001 \Delta A_{420} \text{ min}^{-1} \text{ ml}^{-1}$.



Figura 9. Espectrofotómetro Shimadzu UV-160.

La ecuación para calcular las unidades de polifenoloxidasasa por ml de muestra a usar se describe a continuación:

$$UAE = \frac{m \times 6 \times 10^4}{vol}$$

Ec.6

Donde:

m pendiente de gráfica absorbancia de la reacción de polifenoloxidasasa en función del tiempo

vol volumen del extracto enzimático usado en la celda (ml)

6.2.7.5 Determinación de mesófilos aerobios

Se diluyeron 10 mL de jugo de manzana en 90 ml de agua peptona. Posteriormente se hicieron siembras en agar nutritivo con diluciones decimales para obtener el conteo total de

mesófilos aerobios después de 48 horas de incubación a 35°C en una estufa Imperial III Lab. Line Modelo 302.

6.2.7.6 Determinación de hongos y levaduras

Se diluyeron 10 mL de jugo de manzana en 90 ml de agua peptona. Posteriormente se hicieron siembras en agar papa dextrosa (PDA) acidificado con ácido tartárico al 10%. El conteo total de hongos y levaduras se hizo después de 3 a 5 días de incubación a 25°C en una estufa Imperial III Lab. Line Modelo 302.