

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Caracterización de la enzima

7.1.1 Efecto de la concentración y pH sobre la actividad enzimática de polifenoloxidasas (PPO)

Con el fin de obtener la respuesta de la actividad enzimática de la polifenoloxidasas en función del tiempo, la concentración de enzima y el pH de los sistemas modelo, se siguió el procedimiento descrito en la sección de Materiales y Métodos.

En la Figura 10 se observa el cambio de la absorbancia, como una diferencia entre el valor medido al tiempo t (A) y la inicial (A_0) en función del tiempo. Se aprecia que el sistema con una concentración de enzima de 0.1 mg/ml y pH 6.6 presenta el mayor cambio en la absorbancia y por ende la mayor actividad enzimática, mientras que el sistema con una concentración de enzima de 0.01 mg/ml y pH 4.5 presenta la menor actividad enzimática.

Para todos los sistemas evaluados se aprecia que el cambio de la absorbancia con respecto al tiempo sigue una tendencia lineal hasta los 40-50 segundos para posteriormente tender a una curva asintótica, sobre todo en los sistemas con mayor actividad enzimática.

A partir de la tendencia lineal mencionada se obtuvo la pendiente a emplear en la Ecuación 6, reportada en la sección de Materiales y Métodos, que se utiliza para calcular la actividad enzimática.

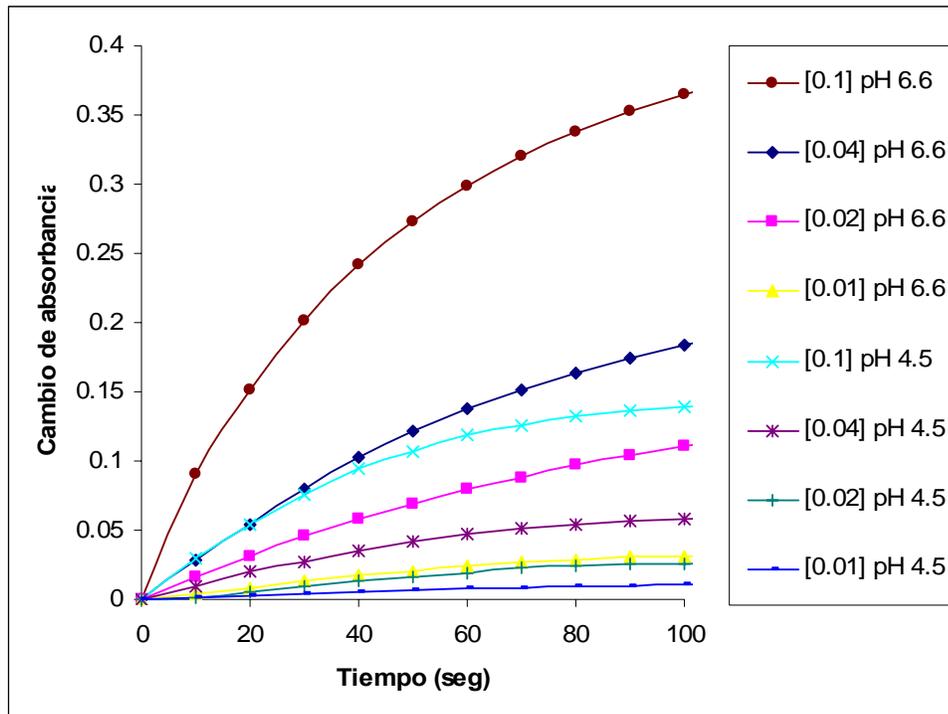


Figura 10. Efecto de la concentración de PPO (mg/ml), pH y tiempo sobre el cambio de absorbancia en sistemas modelo ($T=25^{\circ}\text{C}$).

La actividad enzimática obtenida se graficó frente a la concentración de la enzima y se generó la Figura 11; ahí se puede observar claramente la relación lineal entre la actividad y la concentración de enzima, con dos tendencias una para cada uno de los dos niveles de pH estudiados.

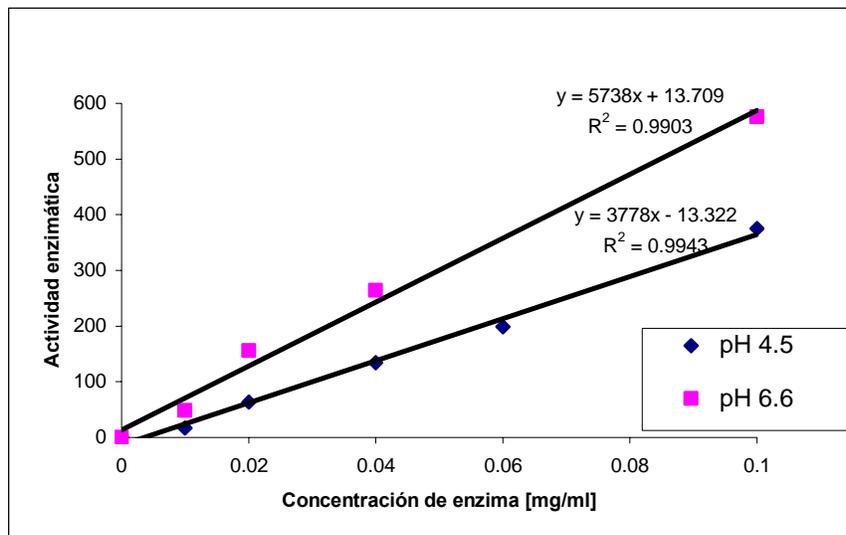


Figura 11. Relación de la actividad enzimática y la concentración de PPO en sistemas modelo a distintos niveles de pH (T=25°C).

Como se puede observar en la Figura 11, a pH 6.6 se tiene una mayor actividad enzimática que a pH 4.5, como lo definen las magnitudes de las pendientes de las líneas rectas, 5738 UAE/mg/ml frente a 3778 UAE/mg/ml respectivamente.

Heimann (1980) indica que la polifenoloxidasas presenta una actividad catalítica máxima a un pH entre 5 y 8. Sin embargo, Lamikanra (2002) reporta que la mayor parte de frutas y verduras tienen un pH óptimo de 6 - 6.5, en el caso de hongos comestibles se encontró a pH 6.5, mientras que las manzanas a pH 3, retienen el 40% de su actividad máxima.

7.1.2 Efecto del pH sobre la actividad de la PPO en sistemas modelo

La Tabla V muestra el efecto del pH sobre la actividad enzimática de la polifenoloxidasas. Se puede observar que existen diferencias entre los valores de actividad enzimática de la polifenoloxidasas obtenidos para cada pH. De hecho, con un análisis de varianza (Apéndice B) se mostró que todos los valores de actividad enzimática para cada pH de la Tabla V, tienen diferencia significativa, a excepción del pH 3.15 y 3.6.

A pH 6 se presenta la mayor actividad enzimática mientras que el sistema modelo a pH 3.15 es menor en un 55%. Por lo tanto, a niveles de pH 3.15, 3.6 y 4 se generan condiciones menos idóneas sobre la actividad enzimática de la polifenoloxidasas.

Tabla V. Efecto del pH sobre la actividad enzimática de la PPO en sistemas modelo.

| pH | UAE/ml | % |
|-----------|---------------|----------|
| 3.15 | 208±20.16 | 45.2 |
| 3.6 | 238±13.27 | 51.7 |
| 4 | 348±16.93 | 75.7 |
| 4.8 | 417±4.21 | 90.7 |
| 6 | 460±26.46 | 100 |

Badui (1986) reporta que el pH óptimo depende del sustrato utilizado y otras condiciones (agentes desnaturizantes, temperaturas y otros).

7.1.3 Efecto del tiempo de almacenamiento en la actividad enzimática de la polifenoloxidasas en sistemas modelo

En la Figura 12 se observa la actividad enzimática de la polifenoloxidasas en los sistemas modelo a diferentes condiciones de pH y tiempos de almacenamiento (4°C). Los sistemas modelo mostraron una disminución de su actividad enzimática inicial en mayor o menor grado; a pH 3.15 después de 48 horas de almacenamiento se redujo el 95%, a pH 3.6 se redujo el 50%, a pH 4 el 39%, mientras que a pH 6 ésta se mantuvo constante.

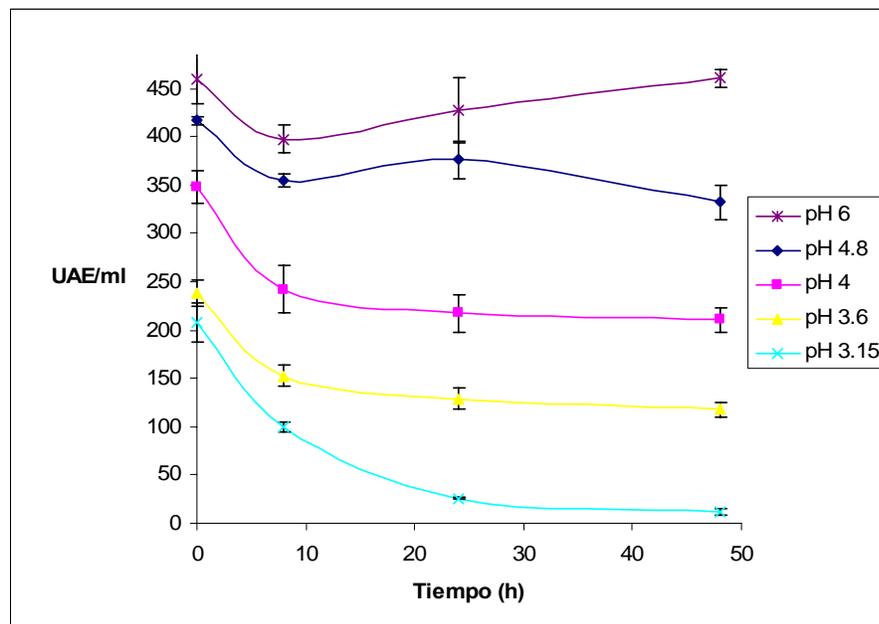


Figura 12. Efecto de almacenamiento (T=4°C) en la actividad enzimática en sistemas modelo a diferentes niveles de pH.

En la Tabla VI, se aprecia que para todos los niveles de pH estudiados a excepción del pH 6 se detectan diferencias estadísticamente significativas entre la actividad enzimática inicial y la actividad después de 48 horas. Dicha diferencia empieza a presentarse a partir de las 8 horas de almacenamiento (Ver apéndice B).

Tabla VI. Diferencias estadísticas (95%) de actividad enzimática de PPO en función del pH y tiempo de almacenamiento (4°C).

| pH | Tiempo de almacenamiento (h) | | | |
|------|------------------------------|---|----|----|
| | 0 | 8 | 24 | 48 |
| 3.15 | ≠ | ≠ | = | = |
| 3.6 | ≠ | = | = | = |
| 4 | ≠ | = | = | = |
| 4.8 | ≠ | = | = | = |
| 6 | = | ≠ | = | = |

= no hay diferencias estadística

≠ existen diferencias estadísticas

Por lo tanto, es posible afirmar que a pH 6, el sistema es estable, mientras que a niveles de pH más ácidos (3.15, 3.6 y 4) habrá menor actividad enzimática que a pH 4.8 y 6 después de almacenarlos.

Al almacenar las muestras a 4°C la actividad enzimática no se detiene. Heimann (1980) menciona que a bajas temperaturas, incluso abajo de -30°C, la actividad enzimática es reducida pero no detenida completamente.

7.1.4 Modelación de la actividad enzimática de polifenoloxidasa en sistemas modelo

En la Figura 13 se modeló la pérdida de la actividad enzimática con una ecuación de primer orden para entender el mecanismo con el que la enzima actúa a diferentes niveles de pH.

$$\log\left(\frac{UAE}{UAE_0}\right) = kt$$

$$D = \frac{1}{k}$$

Ec. 7

Es posible notar las reducciones de la actividad enzimática obtenidas para cada sistema modelo. A pH 3.15 muestra una reducción de 1.24 ciclos logarítmicos, a pH 3.6 reduce 0.31 ciclos logarítmicos, mientras que a pH 4.8 sólo 0.1 ciclos. Por lo tanto, al disminuir el pH aumenta la velocidad de pérdida de actividad enzimática.

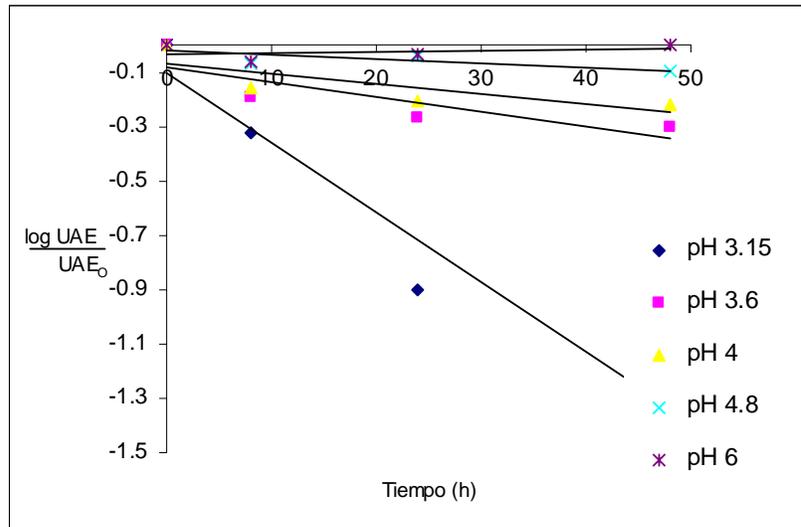


Figura 13. Cinética de primer orden para pérdida enzimática en sistemas modelo a diferentes niveles de pH.

Para modelar la actividad enzimática residual de la polifenoloxidasas, se obtiene el parámetro cinético (k en h^{-1}), por medio del cual se puede obtener el valor de reducción decimal (D en h).

En la Tabla VII se muestra como el valor k es menor para el pH 6 y va aumentando a niveles de pH menores, el valor D es inversamente proporcional, por lo que va aumentando a medida que el pH del sistema modelo se acerca a 6. Como se observa, a pH 3.15 se requieren de 39 horas para reducir el 90% de la actividad enzimática inicial, mientras que a pH 6 no se considera debido a que no hubo diferencia significativa después de 48 horas de almacenamiento.

Tabla VII. Parámetros cinéticos de primer orden para pérdida de actividad enzimática de polifenoloxidasas en sistemas modelo a diferentes niveles de pH.

| pH | k h^{-1} | D h | R^2 |
|------|------------------------|-------------------|-------|
| 3.15 | 2.56E-02 | 39.06 | 0.94 |
| 3.6 | 5.45E-03 | 183.36 | 0.72 |
| 4 | 3.74E-03 | 267.36 | 0.63 |
| 4.8 | 1.57E-03 | 638.95 | 0.63 |

Los valores de ajuste lineal que se obtuvieron para todos los niveles de pH a excepción del pH 3.15 son menores a 0.9, por lo que se modificó la cinética de primer orden utilizando la siguiente ecuación:

$$\log \frac{UAE - UAE_F}{UAE_0 - UAE_F} = k^* t$$

Ec. 8

Donde:

| | |
|------------------|--|
| UAE ₀ | Actividad enzimática inicial/ml |
| UAE _F | Actividad enzimática final/ml |
| UAE | Actividad enzimática/ml al tiempo t |
| k* | constante de reacción (h ⁻¹) |
| t | tiempo (h) |

En la Figura 14, se muestran los datos obtenidos a partir de la ecuación modificada. Se muestran las tendencias lineales del logaritmo de la pérdida de actividad enzimática frente a tiempo, las cuales tienen un mejor ajuste que en el caso anterior, mostradas en la Tabla VIII.

Se observa que las reducciones de actividad enzimática son en el sistema modelo a pH 3.15 de 1.15 ciclos, para el pH 3.6 se observa la reducción de 1.03 ciclos logarítmicos, a pH 4 es de 1.3 ciclos, mientras que a pH 4.8 es de 0.28 ciclos. En el caso del pH 6 no existe pérdida de actividad enzimática notable por lo que no es descrita en este modelo, ya que la ecuación se indefine.

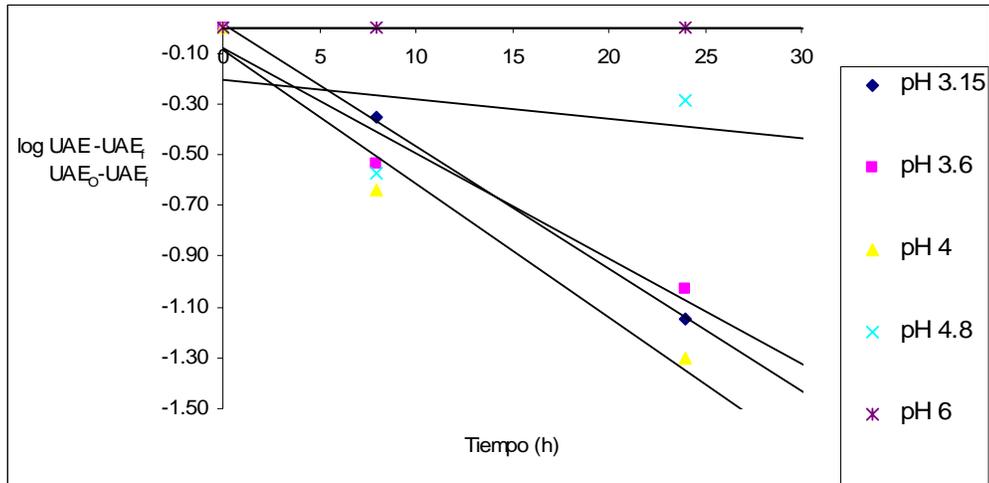


Figura 14. Cinética de primer orden modificado para pérdida enzimática en sistemas modelo a diferente pH.

En la Tabla VIII se muestran los valores k^* para cada sistema modelo, se observa que al igual que en el modelo de primer orden a pH 3.15 se presenta la mayor k^* (constante de reacción). Los valores del ajuste son mucho mayores a 0.96 a excepción del pH 4.8, por lo tanto, no puede decirse que el modelo ajuste a todos los niveles de pH.

Tabla VIII. Parámetros cinéticos modificados para pérdida de actividad enzimática en sistemas modelo.

| pH | k^* h^{-1} | R^2 |
|------|-------------------|-------|
| 3.15 | -4.81E-02 | 0.99 |
| 3.6 | -4.13E-02 | 0.96 |
| 4 | -5.26E-02 | 0.97 |
| 4.8 | -7.63E-03 | 0.11 |

En la Figura 15 se representa la pérdida de actividad enzimática de la polifenoloxidasasa después de 48 horas de almacenamiento (4°C) en sistemas modelo a diferentes niveles de pH, descrita por el modelo de Weibull. Se observa que los ajustes de la Ecuación 2 descrita en

Revisión Bibliográfica, a los datos experimentales, son mejores que los mostrados anteriormente. A diferencia de los anteriores este modelo no describe una tendencia lineal.

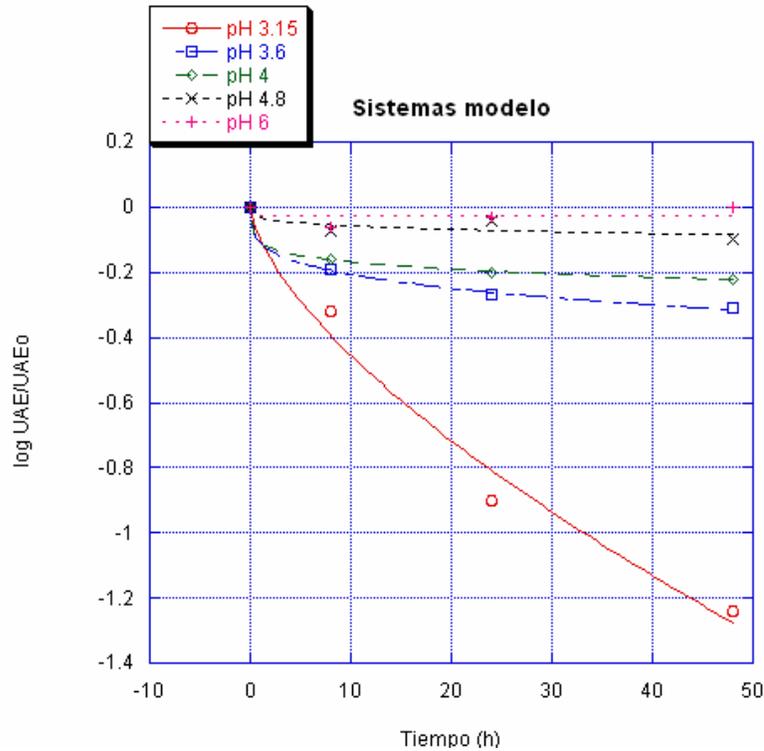


Figura 15. Ajuste del modelo de Weibull a la pérdida de actividad enzimática de la polifenoloxidasasa en sistemas modelo almacenados durante 48 horas (T=4°C).

En la Tabla IX, se muestran los valores “b” y “n” para cada sistema modelo. Los parámetros de Weibull, “b”, indican la velocidad con que se disminuye la actividad enzimática. El pH 6 tiene el valor más pequeño de “b”, lo que indica que la velocidad de pérdida de actividad enzimática es menor y por ende presenta mayor estabilidad de la enzima polifenoloxidasasa, mientras que el pH 3.15 presenta la mayor velocidad de pérdida de actividad enzimática.

El valor de “n” indica la linealidad de la curva, mientras más cercano esté a 1, más lineal será. El pH 3.15 presenta la mayor linealidad, sin embargo todos presentan una concavidad en mayor o menor grado. En este caso, se ve que el ajuste es mucho mayor al de

los dos modelos anteriores. Ninguno de los modelos usados ajusta a pH 6, debido a que no existe pérdida de actividad enzimática en ese sistema. Por lo tanto, se puede concluir que la ecuación de Weibull modela de manera adecuada la pérdida de actividad enzimática en sistemas modelo.

Tabla IX. Parámetros cinéticos de Weibull para sistemas modelo de polifenoloxidasas.

| pH | b | n | R ² |
|------|--------|------|----------------|
| 3.15 | 0.1001 | 0.65 | 0.992 |
| 3.6 | 0.1115 | 0.26 | 0.999 |
| 4 | 0.1119 | 0.18 | 0.998 |
| 4.8 | 0.0328 | 0.24 | 0.884 |

7.2 Actividad enzimática de polifenoloxidasas en jugo de manzana fresco

La actividad de la polifenoloxidasas difiere entre los diferentes frutos e incluso dentro de la misma especie. Esta variación ocurre debido a varios factores como el pH, la fecha de cultivo, el tipo de manzana, la temperatura entre otros.

La temperatura, el pH, la actividad de agua (a_w), la fuerza iónica y la presencia de agentes inhibidores y activadores son factores que alteran fuertemente la actividad enzimática en productos derivados de la manzana (Badui, 1986).

El jugo a emplear en las pruebas tendrá un nivel de pH entre 3.5 y 4 y nivel de sólidos solubles entre 13 y 14° Bx conforme lo marca la norma mexicana (Secretaría de Economía, 2006).

7.2.1 Efecto del almacenamiento en la actividad enzimática de la polifenoloxidasas en jugo de manzana

En la Figura 16 se representa el efecto del tiempo del almacenamiento (4°C) en la actividad enzimática de la polifenoloxidasas en jugo de manzana natural con 13°Bx y a pH 3.64 y en un sistema modelo generado según Materiales y Métodos a pH 3.6. Se muestra que en los dos sistemas la mayor pérdida de actividad enzimática es en las primeras 8 horas de almacenamiento. En el caso del jugo de manzana el decremento de la actividad enzimática es casi lineal mientras que en el sistema modelo presenta un comportamiento curvilíneo. Por lo tanto, se puede concluir que ninguno presenta estabilidad al almacenamiento, ya que siguen reaccionando.

En el jugo de manzana la actividad enzimática va disminuyendo de manera gradual, esto se ve reflejado en el color más oscuro del jugo. El jugo de manzana fresco tiene los sustratos necesarios para llevar a cabo el proceso de oxidación y la enzima en cantidades suficientes, por lo que se lleva a cabo un oscurecimiento enzimático (como se ve en el apartado 7.2.4) y por ende, una pérdida de actividad enzimática de la polifenoloxidasas. A las 36 horas, la actividad remanente que presenta es del 36%. Con un análisis estadístico se encontró que la actividad enzimática del jugo de manzana fresco no cambia de manera significativa al almacenarse durante 2 horas a 4°C (Apéndice D).

Se puede afirmar con un 95% de confianza que el jugo y el sistema modelo no presentan actividad enzimática inicial con diferencia significativa (Apéndice D).

Con un modelo de primer orden se determinó que el valor “k” para el sistema modelo es de 5.45E-3, mientras que para el jugo de manzana es de 1.25E-2, los valores de reducción decimal son de 80 y 183 horas respectivamente.

En el sistema modelo después de 24 horas de almacenamiento se observa el 54% de la actividad enzimática residual mientras que en el jugo de manzana sólo el 45%, esto permite concluir que otros factores diferentes al pH, temperatura y tiempo afectan la estabilidad de la

polifenoloxidasas. Heimann (1980), menciona que los electrolitos alteran la estabilidad enzimática, presumiblemente a efectos inespecíficos.

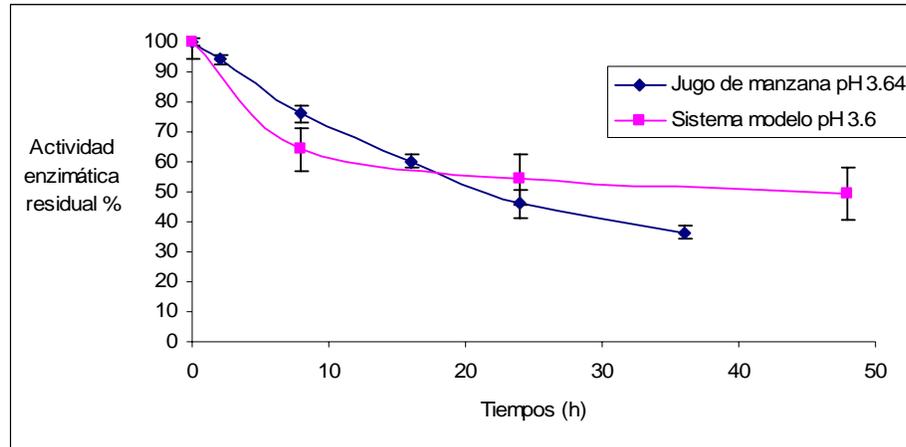


Figura 16. Efecto del almacenamiento en la actividad de la PPO en sistemas modelo y en jugo de manzana ($T=4^{\circ}\text{C}$).

7.2.2 Efecto de la aplicación de tratamientos térmicos en la actividad de la polifenoloxidasas en jugo de manzana

Se realizaron tratamientos térmicos a 60 y 80°C con el fin de observar la resistencia de la polifenoloxidasas en el jugo de manzana (13.5°Bx) a pH 3.59 recién preparado de acuerdo a la metodología descrita en la sección correspondiente.

En la Figura 17 se observa que para el tratamiento a 60°C, el mayor porcentaje de inactivación ocurre en tiempos posteriores a 2 minutos. La actividad enzimática residual después de 5 minutos de tratamiento es de 56%, llegando hasta el 60% después de 15 minutos. Con un análisis estadístico es posible notar que no hay diferencias significativas entre la actividad enzimática al primer y segundo minuto, como tampoco la hay entre los 5 y 15 minutos de tratamiento pero sí entre la actividad inicial y todos los tiempos de tratamiento (Apéndice E).

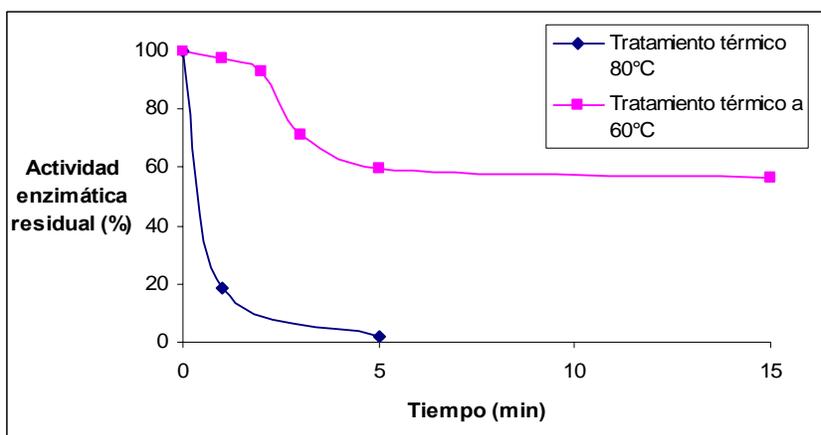


Figura 17. Inactivación de polifenoloxidasas en jugo de manzana tratados a 60 y 80°C.

Se modeló la inactivación de la polifenoloxidasas a 60°C con una cinética de primer orden. Por medio de ésta se determinaron los parámetros k (constante de velocidad) y D (reducción decimal), los cuales son de 0.1134 min^{-1} y 20.31 minutos respectivamente.

Se realizó un tratamiento igual al anterior pero ahora con una temperatura constante de 80°C durante un periodo de 5 minutos. En la Figura 17 se observa que la inactivación enzimática es casi inmediata. En el apéndice E, se observa que hay diferencia significativa entre la actividad enzimática inicial y a los dos tiempos de tratamiento, como también la hay entre el primer minuto y los 5 minutos. Al finalizar el tratamiento la actividad enzimática residual es de 1.9%. Al aplicar la cinética de primer orden se determinó el valor k de 0.7251 min^{-1} y D que equivale a 3.18 min.

Al comparar los dos tratamientos se observa que la polifenoloxidasas es inactivada en menor tiempo a 80°C. La polifenoloxidasas muestra resistencia a temperaturas de 60°C, pero a temperaturas mayores a 80°C se observa una inhibición casi instantánea. Se observa que el valor D disminuye con el aumento de la temperatura. Comparando con la bibliografía se encontró que el valor de reducción decimal en mosto de uva Victoria es equivalente a 46.08

minutos a 50°C (Rapeanu et al., 2006). Mientras que San Martín (1996) reporta un valor D equivalente a 17.73 minutos a 75°C en puré de aguacate.

7.2.3 Efecto de tratamientos térmicos en el color del jugo de manzana

En la Figura 18 se observa la variación del color en el jugo de manzana fresco (pH 3.64, 13°Bx) una vez que alcanzó las temperaturas de 25, 45, 70 y 80°C. En la Tabla X se muestran los tiempos necesarios para lograr las temperaturas requeridas; una vez alcanzadas, el jugo fue enfriado, se tomaron muestras y se les midió el color.

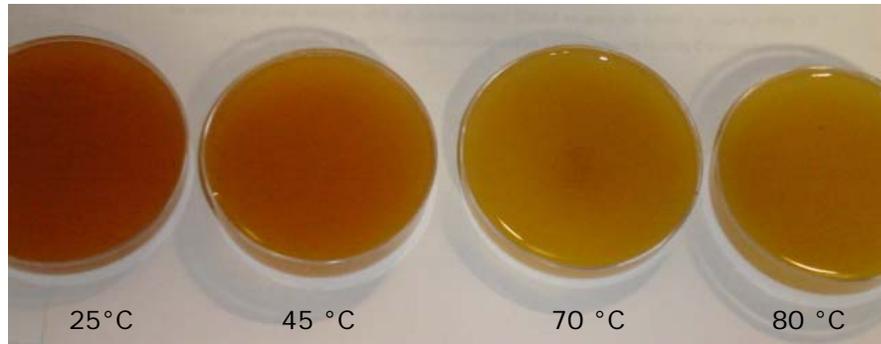


Figura 18. Efecto del tratamiento térmico sobre el color del jugo de manzana.

La Figura 18 muestra el color del jugo de manzana a 25°C el cual es naranja-café mientras que al aumentar la temperatura se va aclarando. A 45°C el color es naranja, mientras que a 70°C ya tiene un tono amarillo similar al que se observa a 80°C.

Tabla X. Tiempo necesario para alcanzar temperaturas.

| Temperatura (°C) | Tiempo (min) |
|------------------|--------------|
| 25 | 0 |
| 45 | 2.6 |
| 70 | 5.6 |
| 80 | 7.2 |

En la Figura 19 se presentan los parámetros de color “L”, “a” y “b” en escala de Hunter para cada muestra. Es posible observar el cambio de la luminosidad al aumentar la

temperatura, este parámetro aumentó 23.1% a 80°C respecto a la muestra a temperatura ambiente. La tonalidad amarilla de la Figura 18, es el resultado del aumento del 18.9% del parámetro “b”. El parámetro “L” muestra diferencia con todos los demás tiempos, el “b” para 25 y 45°C no muestran diferencia, así como tampoco el parámetro “a” para 70 y 80°C pero si con respecto a los demás (Apéndice F).

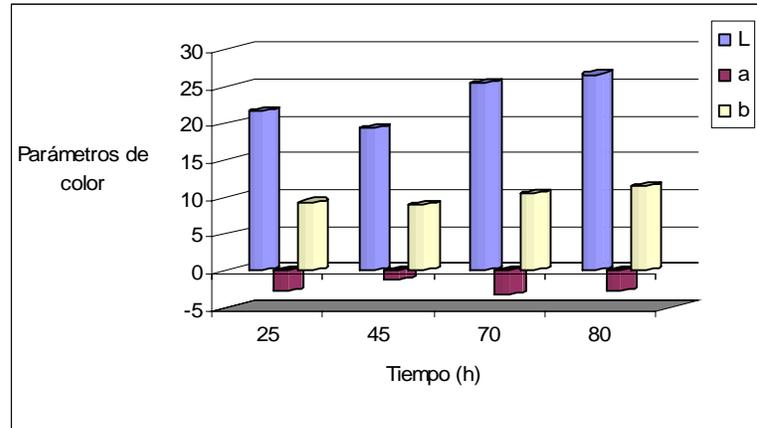


Figura 19. Efecto de tratamientos térmicos en parámetros de color en jugo de manzana.

El cambio neto de color fue calculado tomando como referencia la muestra a temperatura ambiente (25°C). En la Tabla XI se observa que conforme la temperatura aumenta el cambio neto de color es mayor. Con un análisis estadístico (Apéndice F) se verificó que hay diferencia significativa entre las muestras debido al aumento de la temperatura. Esto también se observa en las tonalidades del jugo, sin embargo la magnitud del cambio neto de color no refleja lo que se observa en la Figura 18, debido al método usado para medir color. La altura de la celda es de 1.2 cm, lo cual es insuficiente para medir los cambios.

Se puede concluir que la elevación de la temperatura cambia el color en el jugo de manzana, afectando principalmente los parámetros “L” y “b”.

Tabla XI. Cambio neto de color para jugo de manzana con tratamientos térmicos.

| Temperatura (°C) | ΔE |
|------------------|-----------------|
| 45 | 2.83 ± 0.44 |
| 70 | 4.09 ± 0.16 |
| 80 | 5.49 ± 0.16 |

7.2.4 Efecto del tiempo de almacenamiento en el color del jugo de manzana fresco

En la Figura 20 se observan los parámetros de luminosidad (L) y cromaticidad (a y b) en la escala de Hunter para el jugo de manzana fresco a pH 3.64 almacenado por 36 horas (4°C).

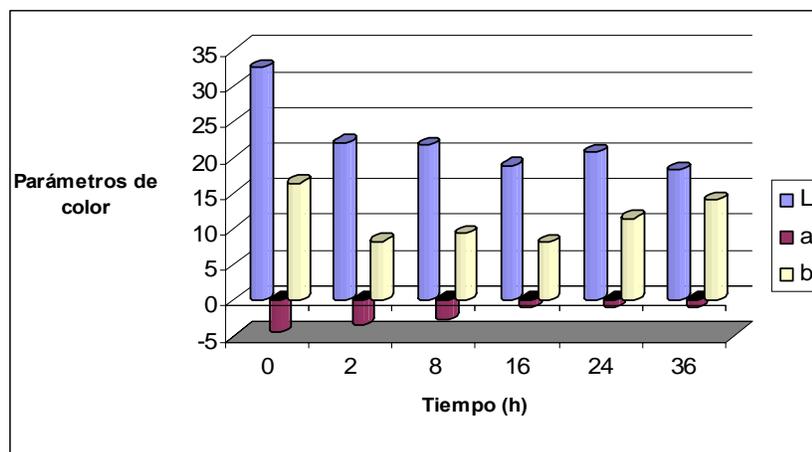


Figura 20. Efecto del almacenamiento en parámetros de color del jugo de manzana (T=4°C).

El parámetro de luminosidad mostró una fuerte disminución después de la primera medición y siguió reduciéndose con el tiempo, siendo 44% menor con respecto al inicial. El parámetro "b" no tiene una tendencia clara, mientras que el "a" mostró un aumento del 20% entre el inicial y el final. Este tiende hacia valores positivos, es decir, que va de tonos rojos a verdes.

Con un análisis de varianza a un 95% de confianza se puede afirmar que el parámetro "a" no mostró diferencias a las 2 y 8 horas de almacenamiento, mientras que el "b" no cambió de manera significativa de las 2 horas a las 8 y 16 horas de almacenamiento (Apéndice G). El color en el jugo de manzana cambia a causa de la actividad enzimática de la polifenoloxidasas que reacciona durante el almacenamiento, como también puede ser causado por los

tratamientos térmicos como en el apartado 7.2.3. En ambos casos se muestra una mayor sensibilidad en la luminosidad.

Durante los tratamientos térmicos el parámetro “b” aumenta dando una tonalidad amarilla, mientras que al almacenarlo tienden más hacia el tono amarillo-verdoso debido al aumento del parámetro “a”.

En la Tabla XII se analizó el cambio neto de color (ΔE) causado por el almacenamiento, se verificó que este cambio es notable entre las muestras, excepto entre las 2 y 8 horas de almacenamiento (Apéndice G). Comparando los cambios netos de color se observa que el ΔE del almacenamiento tiene valores mayores al de los tratamientos térmicos.

Tabla XII. Cambio neto de color para jugo de manzana fresco almacenado por 36 horas ($T=4^{\circ}\text{C}$).

| Tiempo (h) | ΔE |
|------------|------------------|
| 2 | 13.36 ± 0.22 |
| 8 | 13.13 ± 0.17 |
| 16 | 16.45 ± 0.16 |
| 24 | 13.32 ± 0.34 |
| 36 | 14.97 ± 0.24 |

7.3 Aplicación de altas presiones al jugo de manzana

En la Tabla XIII se muestra el número de recirculaciones que corresponde a cada tiempo de tratamiento dentro del homogenizador, el cálculo correspondiente se encuentra en el Apéndice C. El número de recirculaciones esta función del volumen de jugo que haya en el homogenizador, por lo que todas las corridas fueron realizadas con 5L de jugo de manzana, este valor indica el número de veces que el volumen de jugo circula por el equipo, mientras que el tiempo de tratamiento es el tiempo que estuvo operando el equipo.

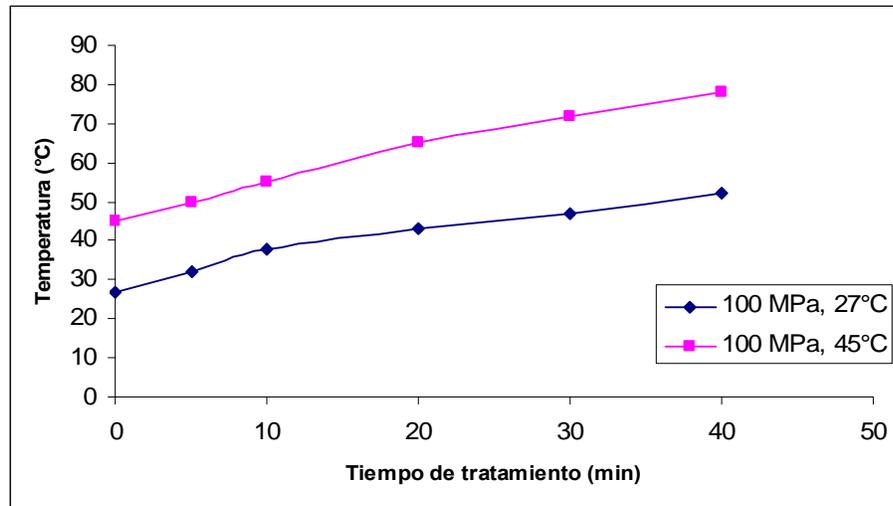
Tabla XIII. Relación entre tiempo de tratamiento y número de recirculaciones en el homogenizador.

| Tiempo de tratamiento (min) | Número de recirculaciones |
|------------------------------------|----------------------------------|
| 0 | 0 |
| 5 | 1 |
| 10 | 2 |
| 20 | 4 |
| 30 | 6 |
| 40 | 8 |

La aplicación de las altas presiones dinámicas modifica la temperatura del jugo, ya que ésta aumenta como se muestra en la Figura 21. El equipo somete al líquido a una presión de 100 MPa, con efectos de cizallamiento y fricción, lo cual causa la elevación de temperatura durante el proceso.

Se efectúan dos tratamientos, el primero en el que se introduce el jugo a 27°C y en el segundo se somete a un calentamiento previo para introducir el jugo de manzana a 45°C. Para efectos prácticos se denominará al tratamiento con temperatura inicial de 27°C, "Tratamiento 1" y al efectuado a 45°C, "Tratamiento 2".

En el "Tratamiento 1" el cambio de temperatura es de 26°C mientras que el "Tratamiento 2" el cambio es de 33°C, lo que se puede explicar debido a que las moléculas llevan movimiento causado por el calentamiento y al experimentar estrangulamiento existe mayor liberación de energía.



* Los valores de incremento de temperatura para cada tiempo de tratamiento son la media de dos corridas

Figura 21. Elevación de la temperatura durante el tratamiento de altas presiones dinámicas.

El efecto del incremento de temperatura sobre la actividad enzimática de polifenoloxidasas es evaluado posteriormente para ver la contribución de este cambio.

7.3.1 Efecto de las altas presiones dinámicas en el pH del jugo de manzana

En la Tabla XIV se reportan los valores de pH del jugo fresco y tratado con altas presiones dinámicas para estudiar si existe algún efecto, ya que según Heremans (2001) el pH puede disminuir debido al trabajo mecánico que se hace sobre los alimentos.

El jugo en el "Tratamiento 1" tiene un pH de 3.63 y 13.1°Bx, mientras que el del "Tratamiento 2" tiene un pH de 3.92 y 13.5°Bx.

Tabla XIV. Efecto del tiempo de tratamiento de altas presiones dinámicas sobre el pH del jugo de manzana.

| Número de recirculaciones | Tiempo (min) | pH | |
|---------------------------|--------------|---------------|---------------|
| | | 100 MPa, 27°C | 100 MPa, 45°C |
| 0 | 0 | 3.63 ± 0.01 | 3.92 ± 0.005 |
| 4 | 20 | 3.64 ± .015 | 3.91 ± .014 |
| 8 | 40 | 3.64 ± .008 | 3.91 ± .005 |

* Los valores de pH para cada tratamiento son la media de dos corridas

Se puede afirmar con un 95% de confianza que no existe una diferencia significativa entre los valores del pH a lo largo de cada uno de los tratamientos (Apéndice H). La compresión del jugo de manzana no causó la disminución del pH a una presión de 100 MPa. Rugerio (2006) estudió el efecto de las altas presiones dinámicas (100 MPa) en el pH de jugo de naranja sin observar cambio.

7.3.2 Efecto de las altas presiones dinámicas sobre la población microbiana de jugo de manzana

En la Tabla XV se muestra la población de la flora nativa en jugo de manzana fresco y tratado 20 y 40 minutos con altas presiones dinámicas. Es posible observar que el efecto de las APD (100 MPa) es muy favorable y efectivo contra mesófilos aerobios en ambos tratamientos. A los 40 minutos de tratamiento, o bien 8 recirculaciones, existe carga microbiana despreciable para los dos tratamientos.

Tabla XV. Efecto de altas presiones dinámicas en la reducción de mesófilos aerobios en jugo de manzana (100 MPa).

| Número de recirculaciones | Tiempo de tratamiento | Mesofilos aerobios (UFC/ml) | | | |
|---------------------------|-----------------------|-----------------------------|---------|---------------|---------|
| | | Tratamiento 1 | DS | Tratamiento 2 | DS |
| 0 | 0 | 6.50E+02 | 5.0E+01 | 9.75E+02 | 1.1E+02 |
| 4 | 20 | 5.50E+01 | 1.4E+01 | 4.50E+01 | 7.0E+00 |
| 8 | 40 | <10 | | <10 | |

A partir de los datos de la población microbiana obtenidos se usa un modelo de cinética de primer orden para describir la inactivación microbiana. Los parámetros cinéticos "k" y "D" serán considerados como aparentes ya que en los tratamientos de alta presión no se

efectúan ni a temperatura ni a presión constante. El jugo es sometido a la presión sólo cuando pasa a través de la tubería por acción del pistón, después es recirculado al tanque de almacenamiento. Esto está en función de las recirculaciones a las que se someterá.

$$\log\left(\frac{UAE}{UAE_0}\right) = kt$$

$$D = \frac{1}{k}$$

En la Figura 22 Se puede observar que a los 20 minutos de tratamiento de altas presiones dinámicas, la flora nativa se redujo para el “Tratamiento 1”, un ciclo logarítmico mientras que en el “Tratamiento 2” se redujeron 1.34 ciclos. Al finalizar el primer “Tratamiento 1” se redujeron 1.81 ciclos logarítmicos, mientras que en el “Tratamiento 2” se redujeron 1.99 ciclos

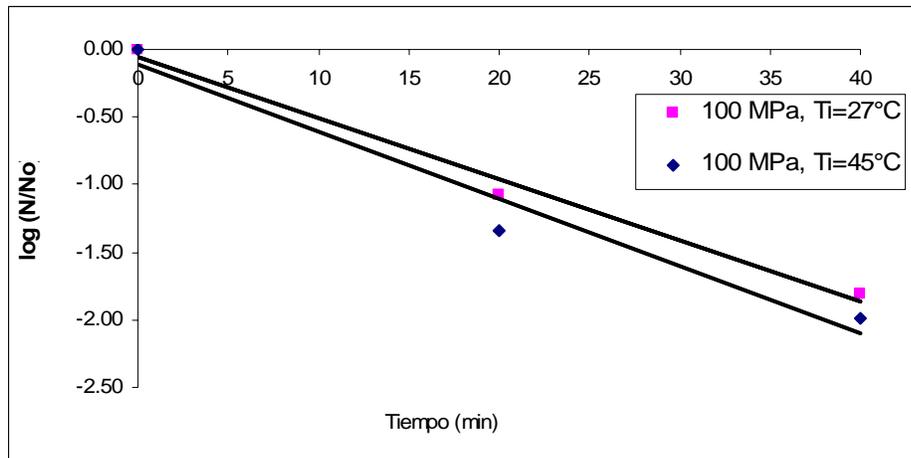


Figura 22. Reducciones logarítmicas de flora nativa en jugo de manzana tratado con altas presiones dinámicas (100MPa).

En la Tabla XVI se muestran los parámetros cinéticos de la inactivación de mesófilos aerobios. El menor tiempo de reducción decimal se obtienen en el “Tratamiento 2” debido a la

elevación de temperatura que ayuda a reducir la carga microbiana, sin embargo, sólo tienen diferencia de 9%.

Tabla XVI. Parámetros cinéticos aparentes de inactivación para mesófilos aerobios en jugo de manzana (100 MPa).

| | Tratamiento | |
|-----------------------------|---------------|---------------|
| | 100 MPa, 27°C | 100 MPa, 45°C |
| k (min⁻¹) | -0.1044 | -0.1145 |
| D (min) | 22.07 | 20.11 |
| R² | 0.98 | 0.96 |

Según Rugerio (2006) en jugo de naranja tratado con APD (100 MPa) durante 40 minutos a pH 4.33 se obtiene una reducción de mesófilos aerobios de 2.97 ciclos logarítmicos con un valor D equivalente a 32.85 minutos mientras que a pH 3.31 se reducen 4.5 ciclos logarítmicos con un valor D igual a 21.64 minutos.

El efecto de las altas presiones dinámicas sobre mohos y levaduras se muestra en la Tabla XVII. Se observa que la población de este tipo de microorganismos presentes disminuye con el tiempo de tratamiento. El efecto es similar al de mesófilos aerobios, ya que se llega a una carga microbiana despreciable.

Tabla XVII. Efecto de altas presiones dinámicas en la reducción de mohos y levaduras en jugo de manzana (100 MPa).

| Número de recirculaciones | Tiempo de tratamiento | Mohos y levaduras (UFC/ml) | | | |
|---------------------------|-----------------------|----------------------------|---------|---------------|---------|
| | | Tratamiento 1 | DS | Tratamiento 2 | DS |
| 0 | 0 | 1.02E+03 | 5.6E+01 | 2.30E+03 | 1.0E+02 |
| 4 | 20 | 2.00E+01 | 1.4E+01 | 2.30E+02 | 1.0E+01 |
| 8 | 40 | <10 | | <10 | |

Al igual que en el caso de los mesófilos aerobios se aplica un modelo de cinética de primer orden. En la Figura 23 se observa la reducción después de 40 minutos de tratamiento, la cual es de dos ciclos logarítmicos con el "Tratamiento 1" y 2.4 reducciones para el "Tratamiento 2".

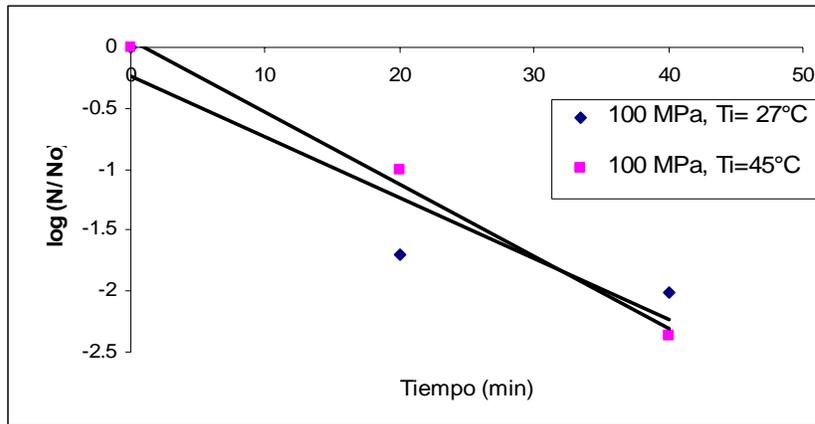


Figura 23. Reducciones logarítmicas de mohos y levaduras en jugo de manzana tratado con altas presiones dinámicas (100MPa).

En la Tabla XVIII se observa que la constante de velocidad es menor en el “Tratamiento 1”, por lo que su valor de reducción decimal es mayor. En ambos tratamientos el valor D es muy similar, sin embargo, el “Tratamiento 1” presenta un ajuste muy bajo.

Tabla XVIII. Efecto de altas presiones dinámicas en los parámetros cinéticos aparentes de inactivación para mohos y levaduras en jugo de manzana (100 MPa).

| | Tratamiento | |
|-----------------------------|---------------|---------------|
| | 100 MPa, 27°C | 100 MPa, 45°C |
| k (min⁻¹) | -1.16E-01 | -1.36E-01 |
| D (min) | 19.94 | 16.94 |
| R² | 0.86 | 0.99 |

Al comparar el efecto de las altas presiones dinámicas en mesófilos aerobios y mohos se puede observar que la inactivación de mohos y levaduras es más rápida que la de mesófilos aerobios. Haciendo un promedio de los valores de reducción decimal, se observa que en mesófilos aerobios se requieren de 21 minutos para reducir el 90% de la población inicial, mientras que para mohos y levaduras se requieren de 18 minutos. Según Hoover (1993) los hongos y las levaduras son más sensibles a la aplicación de las altas presiones que las bacterias.

En estudios anteriores con altas presiones dinámicas se observó de la misma manera una muerte microbiana. Según Cubas (2002) en leche presurizada tratada a 100 MPa durante 60 segundos se reducen 3.65 ciclos. Lechowich (1993) menciona que la membrana celular es el primer sitio de daño originado por la presión, siendo éste la causa de muerte microbiana.

En la Figura 24 se observa el modelo de Weibull que ajusta los valores de inactivación de flora nativa en jugo de manzana tratado con altas presiones dinámicas (100 MPa), cabe mencionar que todas tienen un ajuste de 1.

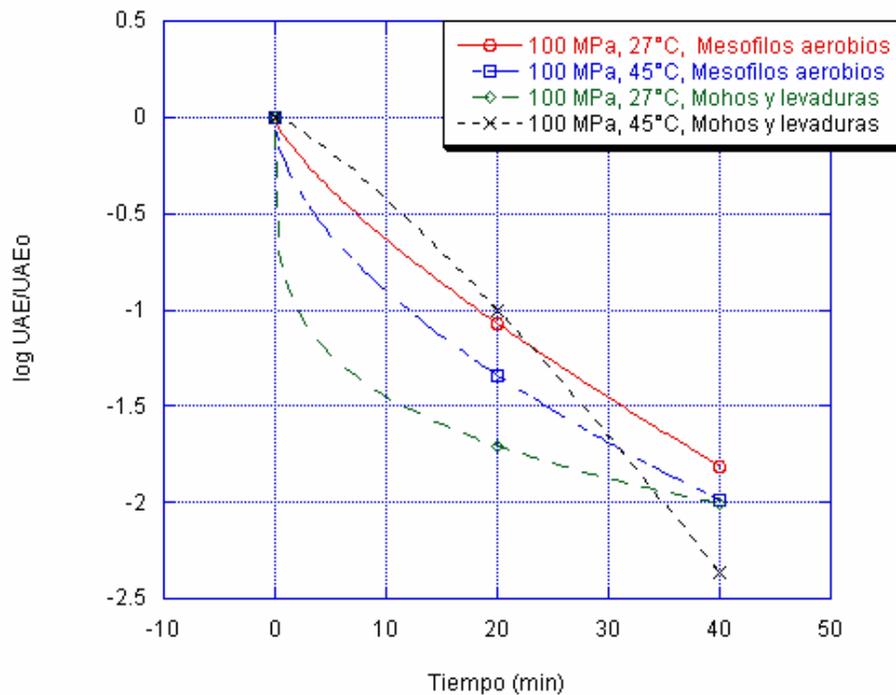


Figura 24. Distribución de Weibull para inactivación de población microbiana en jugo de manzana tratado con altas presiones dinámicas (100MPa).

En la Tabla XIX se muestran los valores “n” y “b” del modelo de Weibull, se puede observar que el “Tratamiento 2” de mohos y levaduras tiene una concavidad muy ligera, sin embargo, ésta es opuesta a las demás. En el “Tratamiento 1” de mesófilos aerobios el valor “b” es menor que el de mohos y levaduras. Sin embargo, en el “Tratamiento 2”, el valor “b” es

menor en mohos y levaduras. El modelo de Weibull ajusta la inactivación, se puede ver que el ajuste en todos los tratamientos es de 1.

Comparando los ajustes de la ecuación de Weibull con los ajustes obtenidos con la cinética de primer orden se puede decir que el modelo de Weibull describe de una mejor manera la cinética de inactivación de los mesófilos aerobios y mohos y levaduras.

Tabla XIX. Parámetros cinéticos del ajuste de la ecuación de Weibull a los datos experimentales de inactivación de población microbiana en jugo de manzana tratado con APD (100 MPa).

| Tratamiento | Microorganismos | n | b | R2 |
|---------------|--------------------|-------|---------|----|
| 100 MPa, 27°C | Mesofilos aerobios | 0.758 | 0.11033 | 1 |
| 100 MPa, 45°C | Mesofilos aerobios | 0.57 | 0.242 | 1 |
| 100 MPa, 27°C | Mohos y levaduras | 0.234 | 0.844 | 1 |
| 100 MPa, 45°C | Mohos y levaduras | 1.23 | 0.0243 | 1 |

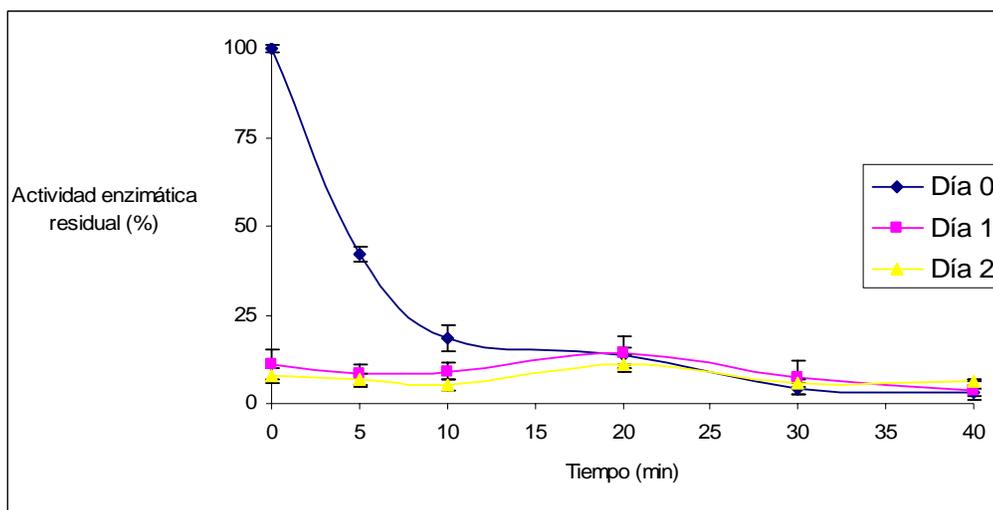
Ruggerio (2006) reporta para jugo de naranja (pH 3.3) tratado con AP (100 MPa) durante 40 minutos una inactivación de mesófilos aerobios con parámetros de la ecuación de Weibull, equivalentes a 0.83 para "n" y 0.14 para "b". Estos valores son muy semejantes a los obtenidos en la inactivación de mesófilos a las mismas condiciones de presión, pH y temperatura, ya que se obtiene un valor "n" equivalente a 0.76 y "b" de 0.11.

7.3.3 Efecto de las altas presiones dinámicas sobre la actividad enzimática de la polifenoloxidasas en jugo de manzana

Con el objeto de evaluar el efecto de las altas presiones dinámicas sobre la actividad de la polifenoloxidasas, se tomaron muestras después de haberse recirculado (0, 5, 10, 20, 30 y 40 minutos). En la Figura 25 se presenta el porcentaje de actividad enzimática residual para el jugo de manzana tratado con 100 MPa y con temperatura inicial de 27°C. La Figura 26

presenta información similar a la presentada en la Figura 25, sólo que en esta el jugo fue incorporado al tratamiento con alta presión (100 MPa) a una temperatura de 45°C.

En ambas figuras se evalúa la actividad enzimática inmediatamente después de la aplicación altas presiones dinámicas (Día 0) y durante un almacenamiento posterior de las muestras durante 24 y 48 horas a 4°C (Día 1 y 2 respectivamente). La muestra correspondiente a “Día 0, tiempo 0”; pertenece a la muestra fresca, en el “Día 1”, es la muestra fresca almacenada durante 24 horas y así respectivamente.



Día 0 = Actividad enzimática de la PPO el día del tratamiento de AP
Día 1 = Actividad enzimática de la PPO de jugo de manzana tratado con APD con 1 día de almacenamiento (4°C)
Día 2 = Actividad enzimática de la PPO de jugo de manzana tratado con APD con 2 días de almacenamiento (4°C)

Figura 25. Efecto de altas presiones en la actividad de la PPO en el jugo de manzana introducido a 27°C (Tratamiento 1).

En la Figura 25 se muestra que al aplicar la alta presión (100 MPa) la actividad enzimática residual disminuye, sin embargo con un análisis de varianza se observa que los valores a los 10 y 20 minutos de tratamiento no tienen diferencia significativa ($P > 0.05$). La mayor disminución de la actividad enzimática de la polifenoloxidasasa se da en los primeros 10 minutos de tratamiento, la cual corresponde al 81%.

Al almacenar la muestra fresca (sin tratamiento) durante 24 horas a 4°C se observa que se perdió el 89% de la actividad enzimática de la polifenoloxidasas, en el caso de las muestras de jugo de manzana tratadas con altas presiones muestran una menor disminución de su actividad, la muestra tratada durante 5 minutos pierde el 33% de la actividad enzimática, mientras que a los 10 minutos sólo se pierde el 9%, a partir de los 20 minutos la actividad enzimática cambia aproximadamente 3%.

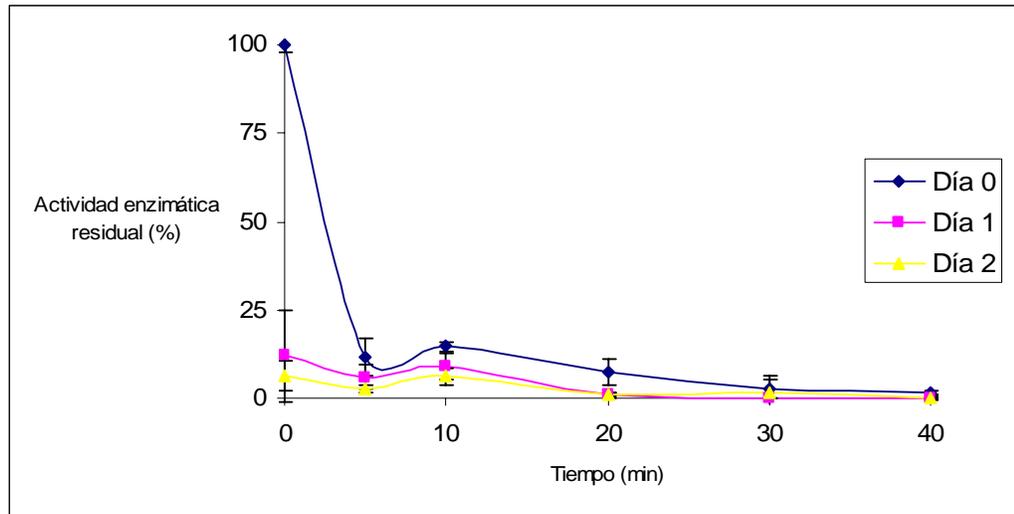
En la Tabla XX se observan las combinaciones de tiempo de almacenamiento y tiempo de tratamiento que no presentan diferencia significativa (Apéndice I). Al almacenar las muestras de jugo de manzana durante 24 o 48 horas se advierte que la actividad enzimática residual no cambia de manera significativa ($P>0.05$) para las muestras tratadas durante 20, 30 y 40 minutos.

Tabla XX. Muestras entre las que no existe diferencia significativa para el tratamiento a 27°C.

| | |
|------|---|
| 0/10 | 0/20, 1/20 |
| 0/20 | 1/0,1/10, 1/20, 2/20 |
| 0/30 | 1/5, 1/10, 1,30, 1/40, 2/0, 2/5, 2/10, 2/30, 2/40 |
| 0/40 | 1/5, 1/30, 1/40,2/0, 2/5,2/10, 2/30,2/40 |
| 1/0 | 1/5, 1/10,1/20, 1/30, 2/0, 2/5,2/10, 2/20, 2/30, 2/40 |
| 1/5 | 1/10, 1/30,1/40,2/0, 2/5, 2/10, 2/20, 2/30, 2/40 |
| 1/10 | 1/20, 1/30,2/0, 2/5, 2/10, 2/20, 2/30, 2/40 |
| 1/30 | 1/40,2/0, 2/5,2/10, 2/20, 2/30, 2/40 |
| 1/40 | 2/0, 2/5,2/10, 2/20, 2/30, 2/40 |
| 2/0 | 2/5,2/10, 2/20, 2/30, 2/40 |
| 2/5 | 2/10, 2/20, 2/30, 2/40 |
| 2/10 | 2/30, 2/40 |
| 2/20 | 2/30, 2/40 |
| 2/30 | 2/40 |

Tiempo de almacenamiento/ Tiempo de tratamiento
(Días / minutos)

Como se puede observar en la Figura 26 la mayor parte de la inactivación se dio en los primeros 5 minutos de tratamiento (88%). Al finalizar el tratamiento a los 40 minutos hubo 2% de actividad enzimática residual. En el análisis estadístico se muestra con un 95% de confianza ($P>0.05$) que no hay diferencia significativa entre las actividades enzimáticas a los 5 y 10 minutos así como tampoco la hay a los 30 y 40 minutos de tratamiento (Apéndice J).



Día 0 = Actividad enzimática de la PPO el día del tratamiento de AP
 Día 1 = Actividad enzimática de la PPO de jugo de manzana tratado con APD con 1 día de almacenamiento (4°C)
 Día 2 = Actividad enzimática de la PPO de jugo de manzana tratado con APD con 2 días de almacenamiento (4°C)

Figura 26. Efecto de altas presiones (100 MPa) en la actividad de la PPO del jugo de manzana introducido al equipo a 45°C (Tratamiento 2).

Después de almacenar el jugo sin tratamiento (Día 0, tiempo 0) por 24 horas la actividad enzimática se reduce un 87.8%. La Tabla XXI resume todas las muestras que no tienen diferencia significativa entre ellas para los diferentes tiempos de tratamiento y tiempos de almacenamiento (Apéndice J). La actividad enzimática para las muestras tratadas por 30 y 40 minutos no muestran diferencia significativa después de 48 horas de almacenamiento.

Tabla XXI. Muestras entre las que no existe diferencia significativa para el tratamiento a 45°C.

| | |
|------|---|
| 0/5 | 0/10, 1/0, 1/10 |
| 0/10 | 1/0 |
| 0/20 | 1/5, 1/10, 2/0, 2/10 |
| 0/30 | 0/40, 1/20, 1/30, 1/40, 2/5, 2/20, 2/30, 2/40 |
| 0/40 | 1/20, 1/30, 1/40, 2/5, 2/20, 2/30, 2/40 |
| 1/0 | 1/10 |
| 1/5 | 1/10, 2/0, 2/5, 2/10 |
| 1/10 | 2/0, 2/10 |
| 1/20 | 1/30, 1/40, 2/5, 2/20, 2/30, 2/40 |
| 1/30 | 1/40, 2/5, 2/20, 2/30, 2/40 |
| 1/40 | 2/5, 2/20, 2/30, 2/40 |
| 2/0 | 2/10 |
| 2/5 | 2/20, 2/30, 2/40 |
| 2/20 | 2/30 |
| 2/30 | 2/40 |

Tiempo de almacenamiento/ Tiempo de tratamiento

(Días / minutos)

Gomes y Ledward (1996) afirman que las altas presiones hidrostáticas modifican la estructura de las proteínas cambiando el comportamiento enzimático. Anese et al. (1995) estudiaron la polifenoloxidasas en manzanas y peras 300 a 900 MPa por 10 minutos sin llegar a una inactivación completa. Sin embargo, hay que recordar que estos experimentos fueron con altas presiones hidrostáticas y no altas presiones dinámicas.

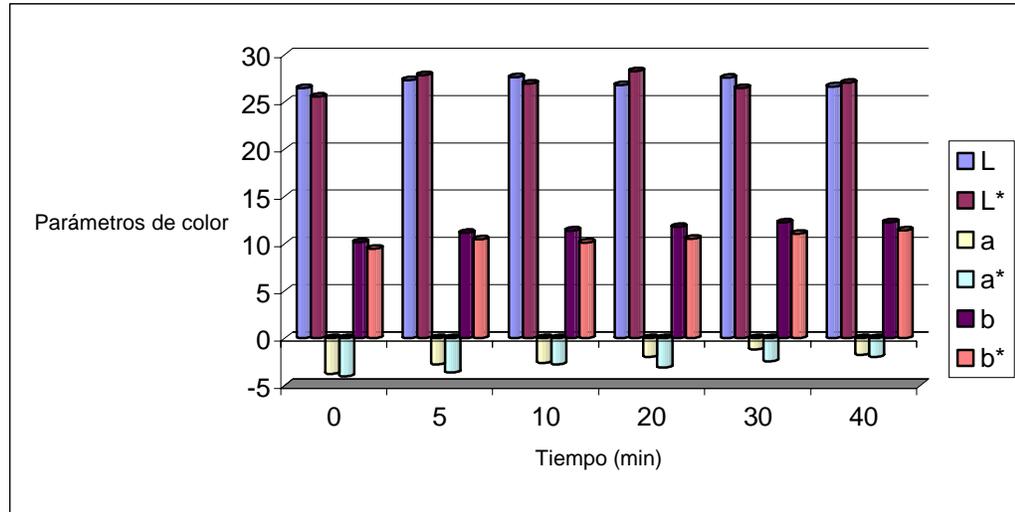
Al comparar ambas figuras (24 y 25) se puede apreciar que en ambos casos la mayor parte de la inactivación se da en los primeros 5 minutos. En el "Tratamiento 1" (Figura 25), se inactiva el 57% de la polifenoloxidasas mientras que en el "Tratamiento 2" (Figura 26) el 88.7%. En ambos tratamientos la actividad enzimática disminuye conforme aumenta el tiempo de residencia en el equipo de alta presión. Al finalizar el tratamiento se obtiene la reducción del 96% de actividad enzimática para el "Tratamiento 1", mientras que para el 2 se obtiene la inactivación del 98.3%. El "Tratamiento 2" logra reducir la actividad enzimática de la polifenoloxidasas un 2.3% más con respecto al primer tratamiento.

En el "Tratamiento 1" (27°C) a partir de los 20 minutos de tratamiento, la actividad enzimática residual empieza a ser despreciable (13.59%), mientras que en el "Tratamiento 2" (45°C) es a partir de los 5 minutos de tratamiento que se observa 11% de la actividad enzimática residual.

Durante el almacenamiento del jugo de manzana fresco y tratado con altas presiones por 24 y 48 horas a 4°C, no se observa reactivación de la actividad enzimática de la polifenoloxidasas para ninguno de los casos. Con un análisis estadístico se observó que no existe diferencia significativa para la actividad enzimática residual obtenida a los 40 minutos con temperatura inicial de 27°C y la actividad enzimática a los 30 y 40 minutos del tratamiento a 45°C (Apéndice K).

7.3.4 Efecto de las altas presiones dinámicas sobre el color del jugo de manzana

La Figura 27 muestra los parámetros de color L, a y b en la escala de Hunter para el jugo de manzana tratado con altas presiones (100 MPa y $T_i=27^\circ\text{C}$). Se observa el aumento del parámetro “b” en un 17%, el parámetro “L” no tiene una tendencia clara, mientras que “a” muestra al final del tratamiento una diferencia de 46%.



* muestra el duplicado de la corrida

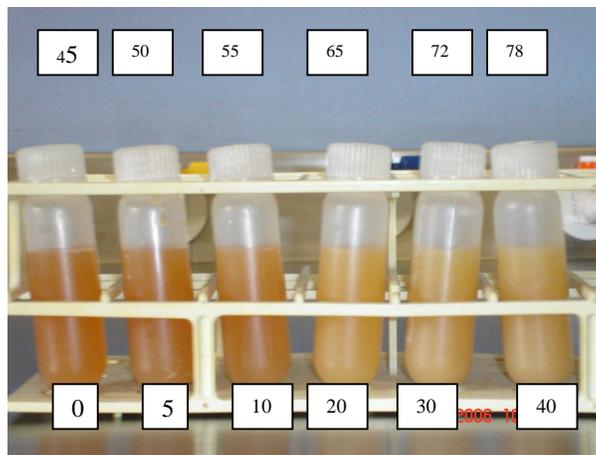
Figura 27. Efecto de las altas presiones dinámicas en los parámetros de color en el jugo de manzana con temperatura inicial de 27°C (Tratamiento 1).

En la Tabla XXII se observa el cambio neto de color entre las muestras tratadas con alta presión con respecto a la muestra fresca. Se encuentra que durante el tratamiento de AP aplicado el color si cambia. Con un análisis de varianza se observó que el cambio neto de color en el jugo tratado con altas presiones dinámicas para cada combinación de tiempos, tiene diferencia significativa ($P<0.5$) (Apéndice L).

Tabla XXII. Cambio neto de color de jugo de manzana tratado con altas presiones dinámicas (100 MPa y $T_i=27^\circ\text{C}$) con respecto al jugo sin tratamiento.

| Tiempo (min) | ΔE Tratamiento |
|--------------|------------------------|
| 5 | 2.07 ± 0.63 |
| 10 | 2.48 ± 0.38 |
| 30 | 2.97 ± 0.24 |
| 40 | 3.59 ± 0.17 |

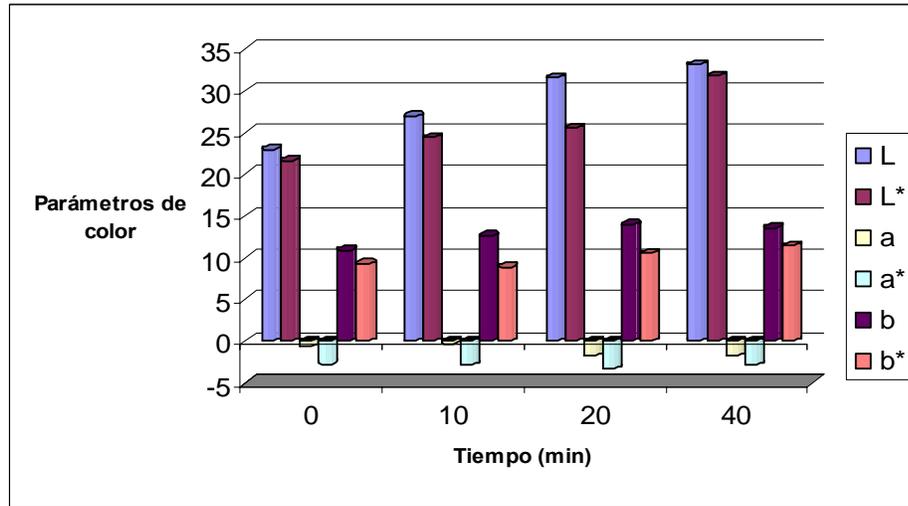
La Figura 28 muestra el efecto de las altas presiones dinámicas durante 40 minutos con una temperatura inicial del jugo de 45°C. A diferencia del tratamiento anterior, el jugo es sometido a temperaturas mayores durante los tratamientos de alta presión. Se observa claramente que el color del jugo de manzana sigue la tendencia estudiada en el apartado 7.2.3, se desarrolla una tonalidad amarilla debido al tratamiento térmico. A partir de los 20 minutos el jugo de manzana presentaba un color amarillo.



°C en la parte superior y minutos en la inferior

Figura 28. Efecto de las altas presiones dinámicas sobre el color de jugo de manzana tratado con AP (100 MPa y $T_i=45^\circ\text{C}$).

En la Figura 29 se presentan los parámetros “L”, “a” y “b” en escala de Hunter para el tratamiento descrito en la Figura 28, se observa que el valor de “a” es negativo y se mantiene constante, el parámetro “b” aumenta 19% dando tonalidades amarillas al jugo, mientras “L” fue el parámetro que mayor aumento tuvo (31%) .



* muestra el duplicado de la corrida

Figura 29. Efecto de las altas presiones dinámicas en los parámetros de color en el jugo de manzana con temperatura inicial de 45°C (Tratamiento 2).

La Tabla XXIII muestra el cambio neto de color de las muestras tratadas con altas presiones con respecto a la muestra sin tratamiento, los cuales muestran diferencia significativa ($P < 0.05$) ente todas las combinaciones de tiempo (Apéndice L).

Tabla XXIII. Cambio neto de color de jugo de manzana tratado con altas presiones dinámicas (100 MPa y $T_i=45^\circ\text{C}$) con respecto al jugo sin tratamiento.

| Tiempo (min) | ΔE Tratamiento |
|--------------|------------------------|
| 10 | 3.53 ± 0.30 |
| 20 | 6.61 ± 0.02 |
| 40 | 10.39 ± 0.06 |

En comparación con el tratamiento de la sección 7.2.3, el cambio neto de color es mucho mayor, debido al tiempo que se mantuvo a temperaturas elevadas. De igual manera, el cambio también es mayor que el observado en el "Tratamiento 1".

Al comparar el efecto de las altas presiones sobre el color en los tratamientos con temperaturas iniciales de 27 y 45°C, se observa que el parámetro “b” aumentó aproximadamente en la misma magnitud, mientras que el parámetro “L” aumentó sólo en el segundo tratamiento debido a la temperatura dando tonalidades amarillas. Por otro lado, en el tratamiento a 27°C, el parámetro “a” tendió hacia tonos rojos, haciendo el jugo más oscuro.

7.3.5 Efecto combinado de temperatura y altas presiones dinámicas en la actividad enzimática de la polifenoloxidasa en jugo de manzana

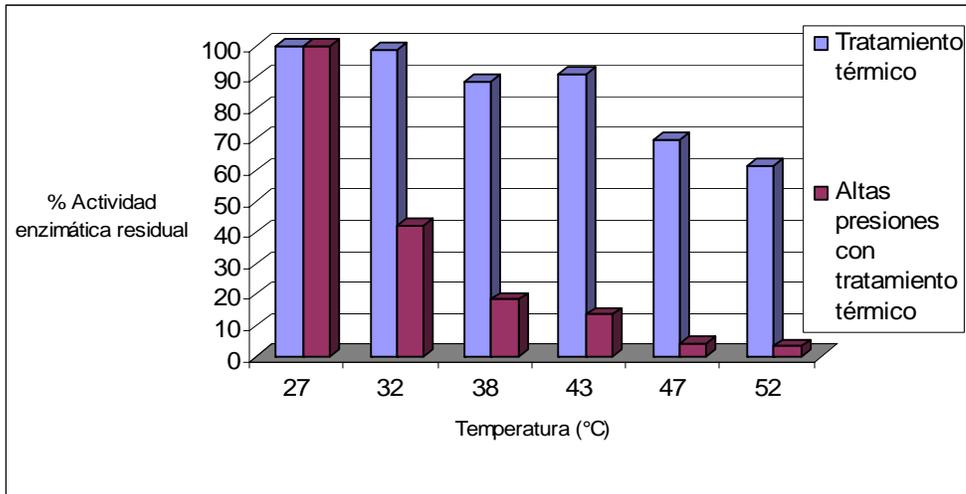
Palou et al. (1999a) mencionan que es notable la reducción de la actividad enzimática de la polifenoloxidasa cuando es combinada con calor o pH bajos, por lo que se analizó la contribución de la temperatura en cada uno de los tratamientos de altas presiones dinámicas aplicados. Las muestras de jugo de manzana fueron tratadas térmicamente siguiendo el patrón de calentamiento en el homogenizador como se describe en Materiales y Métodos.

En las Figuras 30 y 31 se aprecia la reducción de la actividad enzimática de la polifenoloxidasa en jugo de manzana tratado con altas presiones dinámicas y tratamiento térmico equivalente al recibido en el homogenizador.

La Figura 30 muestra que la actividad enzimática es reducida en ambos tratamientos. Se observa que la polifenoloxidasa es resistente a tratamientos térmicos por debajo de los 40°C en periodos cortos de tiempo, ya que después de 20 minutos de tratamiento a 43°C sólo se logra inactivar el 9% de actividad enzimática. Con un análisis de varianza se encontró que a 27 y 32°C no hay diferencias estadísticas en el tratamiento térmico, como tampoco hay diferencia entre 38 y 43°C. Sin embargo, en todas las demás combinaciones si existen diferencias (Apéndice M).

La inactivación enzimática de la polifenoloxidasa después de los 40 minutos de tratamiento térmico (52°C), es de 40%. Mientras que la combinación de la temperatura con

altas presiones inactiva el 98%. Es posible afirmar que el aumento de temperatura no contribuye de manera notable a la inactivación enzimática, sino el efecto de las altas presiones.

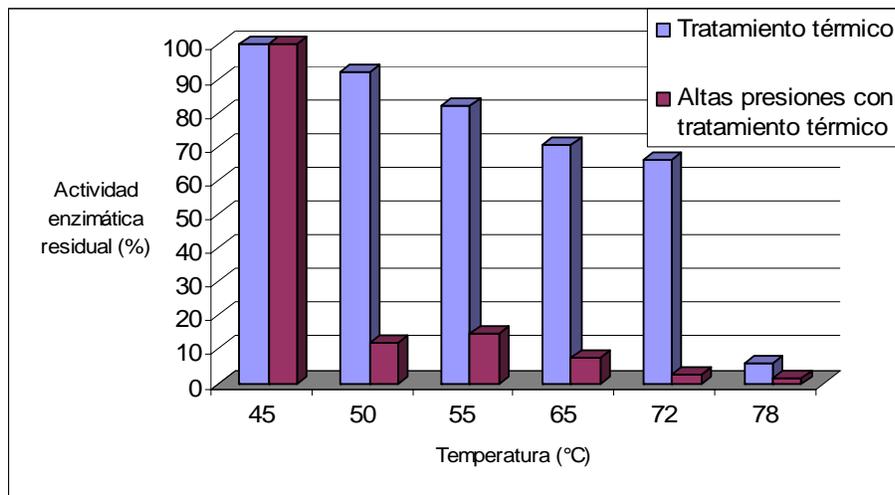


* Temperaturas alcanzadas con tratamiento térmico equivalente al recibido en el homogenizador (0, 5, 10, 20, 30 y 40 minutos).

Figura 30. Comparación entre el efecto combinado de tratamiento térmico y altas presiones (100 MPa) y tratamiento térmico en la actividad enzimática de la polifenoloxidasa en jugo de manzana introducido a 27°C.

La Figura 31 muestra un tratamiento térmico más severo, ya que la temperatura inicial del jugo de manzana es de 45°C, se observa que la inactivación por aumento de temperatura es mayor que en el caso anterior. Con un análisis de varianza se observa que con el tratamiento térmico aplicado no hay diferencia significativa entre la actividad enzimática a 45 y 50°C, como tampoco la hay entre 65 y 72°C como se puede observar en el Apéndice M.

Se observa que a los 20 minutos de tratamiento se alcanzan los 65°C, causando la inactivación del 34% de la actividad de la polifenoloxidasa, mientras que a los 40 minutos de tratamiento térmico se alcanzan los 78°C es de 94%. A temperaturas elevadas (78°C) la contribución del incremento de temperatura en la inactivación de la enzima es considerable. Sin olvidar que sigue existiendo un efecto de la alta presión.



*Temperaturas alcanzadas con tratamiento térmico equivalente al recibido en el homogenizador (0, 5, 10, 20, 30 y 40 minutos).

Figura 31. Comparación entre el efecto combinado de tratamiento térmico y altas presiones (100 MPa) y tratamiento térmico en la actividad enzimática de la polifenoloxidasasa en jugo de manzana introducido a 45°C.

Estudiando los tratamientos antes mencionados, se observa que la actividad enzimática residual al finalizar los tratamientos a 100 MPa no presenta diferencia significativa. Sin embargo, a 100 MPa y temperatura ambiente se cumplieron los dos objetivos principales, el inactivar a la enzima y por ende evitar el pardeamiento y el segundo evitar un tratamiento térmico drástico que podría causar el sabor a cocido o la degradación de nutrientes.

7.3.6 Modelación de inactivación de la PPO en jugo de manzana tratada con AP y tratamientos térmicos

La inactivación de la polifenoloxidasasa en jugo de manzana, debido a los diferentes tratamientos térmicos y de altas presiones dinámicas se modela con una cinética de primer orden, obteniendo las reducciones descritas en la Figura 32.

Se observa que la inactivación enzimática es menor en el tratamiento térmico a 27°C, que la que se obtiene cuando se combina con altas presiones dinámicas. A 100 MPa y temperatura inicial de 45°C se obtiene la mayor inactivación.

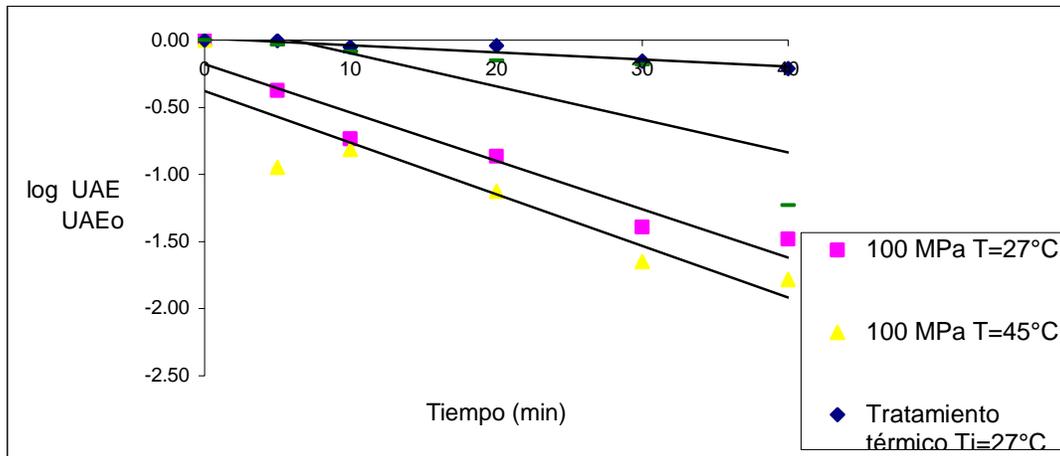


Figura 32. Cinética de primer orden para la inactivación de la polifenoloxidasasa en jugo de manzana tratada con altas presiones dinámicas y tratamientos térmicos.

El tratamiento que se aplicó a 100 MPa y temperatura inicial de 45°C redujo la actividad enzimática de la polifenoloxidasasa 1.78 ciclos logarítmicos, mientras que a 100 MPa y 27°C se redujeron 1.48 ciclos, 0.25 más que en el tratamiento térmico con temperatura inicial a 45°C, ya que este redujo 1.23 ciclos. Por otro lado, la reducción debida al tratamiento térmico a 27°C sólo fue de 0.21 ciclos, lo cual refleja una mínima contribución a la inactivación de la polifenoloxidasasa.

Para continuar con la modelación se calcularon los parámetros cinéticos mismos que se presentan en la Tabla XXIV mediante el uso de la ecuación 7. Los parámetros cinéticos “k” y “D” serán considerados como aparentes ya que en los tratamientos de alta presión no se efectúan ni a temperatura ni a presión constante. El jugo es sometido a la presión sólo cuando pasa a través de la tubería por acción del pistón, después es recirculado al tanque de almacenamiento. Esto está en función de las recirculaciones a las que se someterá.

Como es posible observar, los mayores valores de la constante de velocidad y los menores tiempos de reducción decimal aparente se obtienen cuando el tratamiento es más severo. Los tratamientos con AP tienen menor valor de reducción decimal que los de

tratamientos térmicos. El valor de reducción decimal para el tratamiento a 100 MPa y 27°C es de 64 minutos mientras que el de 100 MPa y 45°C es de 59 minutos, sin embargo, como se puede observar el ajuste para este tratamiento es de 0.86.

Tabla XXIV. Valores k y D aparentes para la inactivación de la PPO de jugo de manzana con tratamientos de AP y tratamientos térmicos.

| Tratamiento | k min ⁻¹ | D min | R ² |
|----------------|------------------------|----------|----------------|
| 100 MPa T=27°C | 3.25E-02 | 30.77 | 0.92 |
| 100 MPa T=45°C | 3.86E-02 | 25.89 | 0.86 |
| TT Ti=27°C | 5.37E-03 | 186.25 | 0.91 |
| TT Ti=45°C | 2.46E-02 | 40.61 | 0.65 |

Para mejorar el ajuste entre la tendencia lineal calculada y los valores experimentales es necesario utilizar otro modelo, que en este caso será el de Weibull, que se describe en la Figura 33.

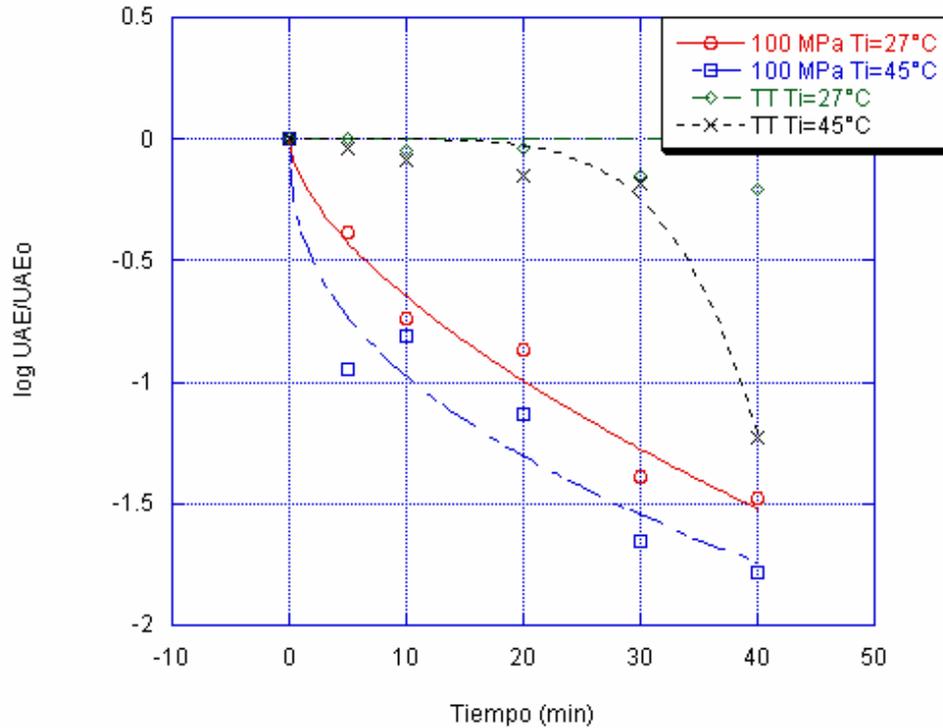


Figura 33. Distribución de Weibull para inactivación de polifenoloxidasasa debido a tratamientos de altas presiones.

La Tabla XXV muestra la concavidad de los tratamientos, es posible advertir que el tratamiento térmico a 45°C tiene la mayor concavidad y con dirección opuesta a los demás tratamientos. El tratamiento a 27°C y presión (100 MPa) es el que más se acerca a la linealidad, ya que su valor de "n" equivale a 0.61. En cuanto al parámetro "b", podemos concluir el tratamiento a 45°C y 100 MPa tiene la mayor velocidad para inactivar la polifenoloxidasas, seguido por el tratamiento a 27°C y 100 MPa. Es posible notar que el valor de ajuste es mayor a 0.97 en todos los casos.

Tabla XXV. Parámetros cinéticos obtenidos del ajuste de la ecuación de Weibull a los datos experimentales de inactivación de la polifenoloxidasas en tratamientos de alta presión dinámica.

| Tratamiento | Presión MPa | n | b | R ² |
|-------------|----------------|----------|----------|----------------|
| T=27°C | 100 | 0.61 | 1.58E-01 | 0.99 |
| T=45°C | 100 | 0.42 | 3.72E-01 | 0.97 |
| TT Ti=27°C | - | 1.27E-03 | 1.68E-03 | 0.98 |
| TT Ti=45°C | - | 5.50 | 1.54E-09 | 0.98 |

Hernández (2007) estudió la inactivación de pectinmetiltransferasa en sistemas modelo tratados con altas presiones dinámicas (100MPa y Ti=45°C), encontrándose que para pH 3 el valor de b es equivalente a 0.03 mientras que a pH 5 es de 0.02, el valor de n es de 0.36 y 0.56 respectivamente. Al igual que en la inactivación de polifenoloxidasas se observa que estos no son lineales. Sin embargo, su ajuste es de 0.98 y 0.99, por lo que se puede concluir que el modelo de Weibull describe de manera adecuada la inactivación enzimática causada por altas presiones dinámicas.