

CAPITULO VI

MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Materia prima

Se utilizó piña (*Anona comosus*), guayaba (*Psidium guajava*) y mango (*Mangifera indica*) variedad Ataulfo; adquiridos de un centro comercial de Puebla. Se procesaron frutas sanas en su estado de madurez adecuada, haciendo una selección y desechando aquellas magulladas o con deterioro por microorganismos.

6.2 Obtención de las pulpas de frutas

Las frutas seleccionadas en buen estado se lavaron, pelaron y deshuesaron en el caso de mango. La pulpa se refinó, pasándola por un pulpeador (Speed-Trol, Stering Electric, Estados Unidos), con el fin de remover la materia fibrosa. Este proceso se llevó a cabo a una velocidad de 420 rpm para prevenir la actividad de la enzima pectinmetilesterasa y evitar la gelación de las pulpas (Argaiz, 1994).

Se llenaron bolsas de plástico con cierre hermético con 1 kg de pulpa aproximadamente y se congelaron a -40°C (congelador Sevco, Estados Unidos), manteniéndolas de esta forma para después utilizarlas mediante una descongelación previa (Argaiz y López-Malo, 1996).

6.3 Estandarización del puré

Para determinar la concentración adecuada de las frutas presentes en el puré, se realizó una prueba sensorial de escala hedónica de nueve puntos (Apéndice A) a 18 jueces no

entrenados para así poder seleccionar la mezcla preferida, evaluando el sabor, color, aroma y aceptación general del producto. Se trabajó con catorce porcentajes diferentes de fruta obtenidas de un diseño de experimentos de mezclas para tres componentes donde el porcentaje mínimo de pulpa es el 20% :

- 1.- 20% piña-20% guayaba-60% mango
- 2.- 20% piña-60% guayaba-20% mango
- 3.- 60% piña-20% guayaba-20% mango
- 4.- 20% piña-40% guayaba-40% mango
- 5.- 40% piña-20% guayaba-40% mango
- 6.- 40% piña-40% guayaba-20% mango
- 7.- 33% piña-33% guayaba-33% mango
- 8.- 27% piña-27% guayaba-47% mango
- 9.- 27% piña-47% guayaba-27% mango
- 10.- 47% piña- 27% guayaba-27% mango
- 11.- 20% piña-20% guayaba-60% mango
- 12.- 60% piña-20% guayaba-20% mango
- 13.- 20% piña-60% guayaba-20% mango
- 14.- 20% piña-40% guayaba-40% mango

Los jueces calificaron las muestras en base a su agrado por la mezcla de puré preferida. Esta se determinó realizando un ANOVA de una vía con el programa MINITAB para Windows.

6.4 Caracterización de las pulpas

Se hicieron las determinaciones de pH, °Brix y % de acidez titulable y color a los purés de piña, guayaba y mango por separado antes y después de congelarse y a la mezcla seleccionada por los jueces, de acuerdo a los siguientes métodos:

6.4.1 pH

Se determinó por triplicado, con un potenciómetro digital (Orion, 420-A, Estados Unidos) por inmersión directa del electrodo en la muestra.

6.4.2 Determinación de sólidos solubles

Se determinaron por triplicado los sólidos solubles (°Brix) de las pulpas de frutas con un refractómetro digital ATAGO a 25°C.

6.4.3 % de acidez titulable

Se determinó por triplicado en base al método del AOAC (1995), con la muestra diluida 1:1 por titulación con una solución de hidróxido de sodio 0.1 N (Merck, Alemania) hasta el punto de vire de la fenolftaleína como indicador y se expresa como porcentaje de ácido cítrico que es el mayormente presente en las frutas.

$$\%acidez = \frac{(N_{NaOH})(V_{NaOH})(0.064)}{P} \times 100 \quad (2)$$

Donde:

N = la normalidad de la solución de hidróxido de sodio utilizado para titular

V = el volumen de la solución de hidróxido de sodio gastado en la titulación

P = el peso de la muestra

0.064 meq del ácido cítrico

6.5 Color

Se determinaron los parámetros L a b de la escala Hunter usando un Colorímetro (Gardner-colorgard System 0.5, Estados Unidos) en la prueba de reflectancia a las muestras frescas, descongeladas y tratadas térmicamente. Las mediciones se realizaron por triplicado y con los valores obtenidos se calculó la diferencia neta de color (ΔE), el tono (hue, H) y la pureza (chroma, C) del color en cada uno de los purés a partir de las siguientes formulas (Jiménez y Gutiérrez, 2001):

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

$$H = \tan^{-1}\left(\frac{b}{a}\right) \quad (3)$$

$$C = \sqrt{a^2 + b^2} \quad (4)$$

Donde:

a_0 , b_0 y L_0 son los valores de referencia del producto al tiempo cero del tratamiento térmico.

6.6 Concentración de ácido ascórbico

La concentración de ácido ascórbico se determinó por triplicado a cada una de las muestras con y sin tratamiento térmico siguiendo la técnica volumétrica del 2,6-diclorofenolindofenol, método 967,21 del AOAC (1995) (Apéndice B).

6.7 Actividad enzimática de pectinestearasa

La actividad de la enzima pectinestearasa se realizó por la técnica del pH estático reportada por Argaiz (1996), que consistió en mezclar 10 mL de puré con 10 mL de una solución de NaCl 2M, ajustando el pH a 7.5 y manteniéndose en agitación por un período de una hora a 4°C en un baño de hielo.

Después del tiempo de extracción de la enzima, se tomaron alícuotas de 10 mL de muestra y se le agregaron 10 mL de solución de pectina al 1% cuyo pH se ajustó previamente a 7.5, manteniéndose en agitación por 30 min; enseguida se midió el pH y se tituló con una solución de NaOH 0.0004 hasta alcanzar un pH de 7.5.

Los resultados obtenidos se expresaron como unidades de pectinestearasa UPE/mL (meq/min.mL). La actividad de la enzima se expresó como microequivalentes de éster hidrolizados durante el tiempo de tratamiento por gramo de puré o néctar. La actividad enzimática se calculó con la siguiente fórmula:

$$UPE \quad / \quad mL = \left[\frac{v \times \frac{N}{1000}}{t \times a} \right] \times 1 e^6 \quad (5)$$

Donde:

v = volumen de la solución de NaOH usado para titular

N = normalidad de la solución de NaOH usado para titular

t = tiempo de agitación

a = alícuota

6.8 Estandarización del néctar

Este se preparó a partir de las concentraciones de piña, guayaba y mango seleccionadas previamente por los jueces para el caso del puré y se les adicionó la cantidad requerida de un jarabe de sacarosa necesario para alcanzar las siguientes características: 40% de pulpa y 13°Brix.

Se homogenizó el néctar ya preparado durante 10 min a una velocidad baja en un homogenizador (Silverson, L4R, Estados Unidos).

Los cálculos realizados para la elaboración del néctar se presentan en el apéndice C.

6.9 Caracterización del néctar

Se determinó °Brix, pH y % de acidez titulable al néctar de piña-guayaba-mango por los métodos anteriormente se descritos.

De igual manera, se determinó el color, la concentración de ácido ascórbico, la actividad de la enzima pectinestearasa de acuerdo a los métodos descritos anteriormente.

6.10 Aplicación de tratamientos térmicos

Considerando la técnica de Bigelow y Esty (1920), se pusieron 10 mL de la muestra (puré o néctar) en tubos Pyrex (13.5 x 160 mm) y se colocaron en un baño de agua caliente a temperatura constante (Poly Therm, Science/ Electronics, Estado Unidos). Las muestras fueron sometidas a cuatro diferentes temperaturas 75, 80, 85 y 90°C, durante 10 diferentes períodos de tiempo 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, y 45 min. Una vez terminado el tratamiento térmico, los tubos se enfriaron con agua helada.

La evolución de temperaturas de las muestras se registraron usando termopares tipo T colocados en el centro de los tubos y conectados a un lector de temperaturas (Cole Parmer, 60010-2392, Barrington IL)(Argaiz y López-Malo, 1996).

Una vez realizado el tratamiento térmico y su posterior enfriamiento se determinaron los cambios en color, concentración de ácido ascórbico y actividad enzimática en las de las muestras, al tiempo cero y a cada una de los diferentes tiempos de tratamiento restantes en base a la metodología que se describió anteriormente.

6.11 Determinación de la cinética de inactivación de enzimas, degradación de ácido ascórbico y color

Con los datos obtenidos después del tratamiento térmico se graficó por separado el logaritmo natural de la fracción remanente de actividad enzimática, concentración de ácido

ascórbico y cambios en color de los productos en función del tiempo de tratamiento. Se obtuvieron las constantes de velocidad de inactivación o degradación que son las pendientes de las curvas. A partir de las constantes de velocidad de inactivación o degradación que presentó la mayor R^2 que mejor describía la inactivación de la enzima pectinesterasa se calcularon los parámetros D, empleando la ecuación:

$$D = \frac{2.303}{k} \quad (6)$$

Donde:

k = pendiente de la curva

Esto se realizó para las diferentes temperaturas evaluadas. Con los valores de los parámetros D (log D) y la relación con la temperatura se calcularon los valores z para la inactivación de la enzima pectinesterasa, degradación de ácido ascórbico y cambios en color.

6.12 Obtención de los valores de z

Estos valores sin corregir (no considerando el efecto del tratamiento térmico durante el CUT en la inactivación de la enzima pectinesterasa) se obtuvieron del inverso positivo de la pendiente, que resultó de graficar el log D contra la temperatura T.

Los valores de z corregidos se obtuvieron por el método descrito en el apéndice D, que consistió en considerar el efecto de la elevación de la temperatura (CUT) aplicado en la inactivación de la PE, degradación de ácido ascórbico y color.

6.13 Cálculos de las energías de activación

Para la obtención de las energías de activación (E_a) de cada uno de los parámetros a estudiar al néctar de piña-guayaba-mango se calcularon las pendientes de la gráfica de Arrhenius del $\ln(k)$ contra el inverso de la temperatura ($1/T$) en K de acuerdo a la ecuación:

$$\ln(k) = -\frac{E_a}{RT} + C \quad (7)$$

Donde:

R = Constante de los gases ($1.987 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$)

T = Temperatura en K

C = $\ln A$

Las pendientes se calcularon por regresión lineal.

6.14 Determinación de los cambios sensoriales en los productos de piña-guayaba-mango durante las aplicación de calor

Las muestras fueron tratadas térmicamente a 75, 80, 85 y 90 °C de acuerdo a la técnica de Bigelow y Esty (1920). Se establecieron tiempos de tratamiento entre 1.5 y 3 veces el valor D para la inactivación de la enzima pectinesterasa con incrementos de 0.25 D. Las muestras se evaluaron por medio de jueces no entrenados hasta encontrar el tiempo de tratamiento en que los jueces no detectaron un cambio en sabor y el tiempo en que detectaron dicho cambio. Para esta determinación, se utilizó una prueba triangular trabajando con 20 jueces no entrenados. Se les presentó a los panelistas unas tríadas de

muestras codificadas utilizando un cuestionario que consistía en identificar la muestra diferente (Apéndice E), que para este caso dos muestras eran iguales y una era diferente. Con los resultados obtenidos se hicieron los cálculos correspondientes. Si el número de jueces que había detectado la muestra diferente era menor al que se establecía como mínimo en las tablas; la prueba era (-) y si era mayor al establecido la prueba se consideraba (+).

La significancia de los resultados de la evaluación sensorial se determinó utilizando las tablas Larmond (1976), con un nivel de probabilidad de 95 y 99%.

El parámetro D se definió como el tiempo de tratamiento necesario a cierta temperatura para producir un cambio perceptible al sabor de los jueces por las muestras (FCF).

El parámetro z se obtuvo a partir de la regresión del logaritmo del tiempo mínimo requerido para que la muestra obtuviera una diferencia sensorialmente detectable por el juez.

6.15 Determinación de los tiempos de inactivación térmica

Se determinaron los tiempos de inactivación térmica (TIT) de la actividad enzimática de la pectinesterasa para la cual; las muestras se trataron térmicamente de acuerdo a la técnica de Bigelow y Esty (1920) a temperaturas de 75, 80, 85 y 90 °C y tiempos entre 1.5 y 3 veces el valor de D (determinado para la inactivación de la enzima pectinesterasa a cada temperatura hasta alcanzar el tiempo de inactivación enzimática).

Se siguió la técnica propuesta por Rostchild et al., (1975). En el cual se mezclaron 30 ml de una solución de pectina con 30 ml de néctar de piña-guayaba-mango. El pH fue ajustado a 7.5 con una solución de NaOH 0.1 N y se adicionó 180 ml de agua destilada, se agregó 1 ml de CaCl₂ 1 N y 2 gotas de tolueno. Las muestras se incubaron por 48 horas. Se preparó una muestra control sin actividad enzimática que consistió en someter los 30 ml de muestra a ebullición por 20 minutos. Posteriormente se determinó la viscosidad utilizando un viscosímetro Brookfield DV-1 (aguja H1 y 100 rpm). Un incremento en la viscosidad comparado con el sistema control indica una actividad de la pectinesterasa (prueba +) mientras que si no hay un incremento en la viscosidad, se considera actividad nula por parte de la enzima (prueba -). Definiendo al tiempo de reducción decimal D como el tiempo necesario para alcanzar la inactivación enzimática sin cambio en la viscosidad a determinada temperatura.

6.16 Curvas de penetración de calor

Empleando los datos de evolución de la temperatura obtenidos durante los tratamientos térmicos se graficaron las curvas de penetración de calor. Se determinaron los tiempos de tratamiento óptimos que dan el valor F requerido, sobre la base de los valores D y z para la inactivación de la enzima pectinesterasa, degradación de ácido ascórbico y desarrollo de sabor a cocido mediante el método gráfico (Bigelow *et al.*, 1920) y el método de la fórmula (Ball, 1923).

6.17 Optimización del proceso de pasteurización

Se graficaron los logaritmos de los tiempos de tratamiento para la inactivación de la enzima, degradación de ácido ascórbico, degradación de sabor y el tiempo de inactivación

térmica para pectinesterasa contra la temperatura y se encontraron los tratamientos térmicos óptimos con el fin de conservar los atributos sensoriales y nutrimentales y a la vez, también inactivar la enzima pectinesterasa.