

CAPITULO 3

MATERIALES Y METODOS

3.1 Materia prima

Para éste estudio se utilizó manzana (*Malus sylvestris*) de la variedad Golden Delicious. Cada lote de fruta que se utilizó se adquirió en un centro comercial de la ciudad de Puebla. Las manzanas se eligieron de tal manera que fueran homogéneas en cuanto a tamaño y grado de madurez.

Fig 7. Manzana variedad Golden Delicious utilizada para la impregnación al vacío

En la determinación de la porosidad efectiva se usó sacarosa grado comercial para la preparación de la solución isotónica. El jugo de manzana utilizado como medio de impregnación fue de la marca “Sonrisa” adquirido en un supermercado de la ciudad de Puebla. Se utilizó la leche fermentada “Yakult” para obtener las células de *Lactobacillus*

casei. Se hacía un recuento inicial de microorganismos para tener como base la cantidad de microorganismos a incorporar.

Fig 8. Jugo Sonrisa y Yakult marcas comerciales utilizados para la impregnación al vacío

3.2 Preparación de la muestra

La fruta se conservó en refrigeración por un tiempo no mayor a 7 días. Se seleccionaron manzanas libres de daños físicos. Se lavaron manualmente con agua y jabón para eliminar posibles microorganismos de la cáscara. Posteriormente se cortaron los trozos de manzana de dimensiones determinadas con ayuda de un cortador de frutas.

3.3. Materiales de trabajo

Equipo de Impregnación

Se utilizaron desecadores de 1L de capacidad con tapa hermética y válvula para ejercer vacío, mallas de plástico adaptadas al diámetro del desecador, pesas de 200 g y una bomba de vacío Cenco-Hyvac (Fig 9).

Fig 9. Equipo de impregnación al vacío utilizado

Liofilizador

Se utilizó un liofilizador industrial LABCONCO, el cual permite mantener las muestras congeladas a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y posteriormente sublimar el agua a temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$), a una presión de vacío de 10 micrones de Hg.

Fig 10. Liofilizador

Secador

Para el secado con aire caliente se utilizó un secador con bandejas construido dentro de las instalaciones de la Universidad de las Américas-Puebla, el cual utiliza como medio de secado aire caliente inyectado por una bomba Komblez modelo CGP-13255 y calentado por resistencias eléctricas. Para tomar la temperatura de bulbo seco se utilizó un termómetro de escala $10\text{-}100^{\circ}$. El equipo dispone de una balanza analítica marca OHAUS modelo DS4KD, de la cual se suspende bandejas del secador y se registran los cambios de peso con respecto al tiempo

Fig 11. Secador con bandejas

3.4 Métodos analíticos

Se determinaron las características iniciales de la materia prima por medio de los parámetros que se describen a continuación:

- Humedad. Se determinó en la fruta fresca por medio del método 22.013 del A.O.A.C (1984) que se basa en determinar la diferencia entre el peso de la muestra húmeda y el peso de la muestra seca.
- Sólidos solubles. Se determinó los sólidos en el jugo de manzana, la solución de sacarosa, el yakult y la fruta fresca y después de haber sido impregnada, por medio de un refractómetro digital Atago PR-1 a 25°C, se obtuvo una lectura en °Bx.
- pH. Se determinó en el puré de la fruta fresca y en el puré de la fruta después de ser impregnada, el jugo de manzana y yakult por inmersión del electrodo de un potenciómetro Beckman.
- Acidez titulable. Se determinó por medio de la titulación de la muestra molida de fruta fresca con y sin impregnar, también después del tratamiento de secado; así como al jugo de manzana con una solución de hidróxido de sodio (0.1N).
- Actividad de agua. Se determinó en la fruta fresca, impregnada y secada, utilizando un higrómetro de punto de rocío AquaLab CX-2. Se calibró y operó como lo describen López-Malo, et al. (1993).

- Densidad real. Se determinó en el puré de manzanas por medio del cociente del peso de la fruta sin aire entre el volumen que ocupa en un picnómetro para determinar la densidad de sólidos.
- Densidad aparente. Se determinó en los trozos de manzana por medio del cociente del peso de aire de la fruta entre el peso de la fruta en el agua.
- Porosidad total. Se determinó por medio de la siguiente ecuación

$$Porosidad = \frac{r_{real} - r_{aparente}}{r_{aparente}}$$

- Coefficiente de rehidratación. Se pesaron 0.5 gramos de muestra y se suspendieron en 30 mL. de agua destilada. Después de 15 minutos se escurrieron y se tomó el peso final. El coeficiente de rehidratación se expresa como el cociente del peso final después de la rehidratación entre el peso inicial de la manzana, multiplicado por cien para expresarlo como porcentaje.
- Color. Se determinó midiendo los parámetros: L (luminosidad), a (rojo a verde) y b (amarillo a azul) en la escala de Hunter, en un colorímetro Color Gard System/05. Este equipo se calibró usando el estándar negro con el Cero referente estándar y con el color blanco con valor de L=+92.89, a=-1.05 y b=+0.82. Se realizaron mediciones por triplicado de trozos de manzana.

3.5 Metodología

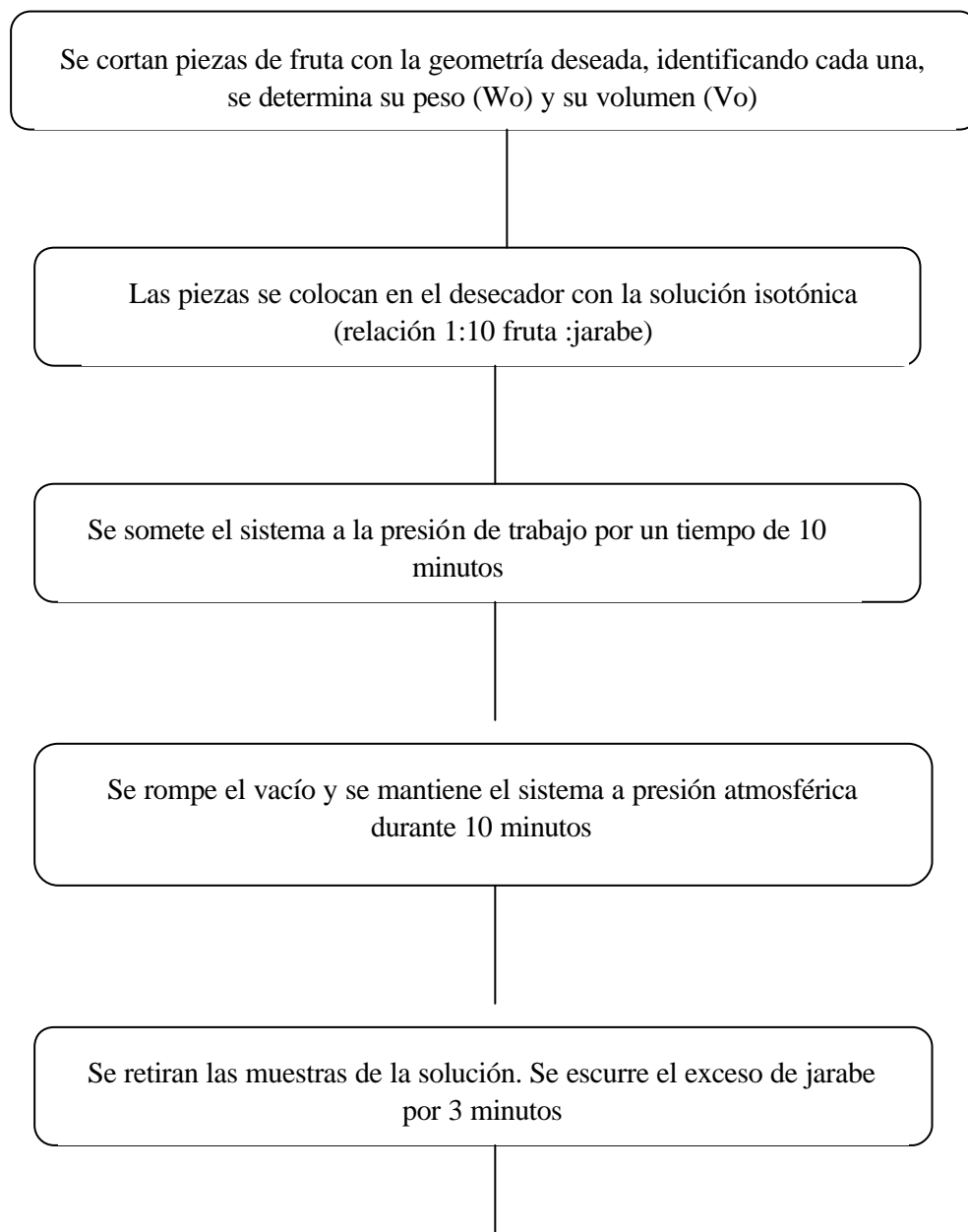
3.5.1 Determinación de la porosidad efectiva

El equipo que se utilizó se presenta en la figura 9 el cual consta de un desecador de vidrio de capacidad de 0.5 L, unido a un controlador y vacuómetro de una bomba de vacío. Su máxima presión de vacío es de 500 mbar. En el interior se coloca la muestra de manzana con la solución isotónica de sacarosa.

Para la determinación de la porosidad efectiva se sigue el método propuesto por Fito y Pastor (1994). En la figura 10 se presenta el diagrama de flujo de ésta metodología. Esta prueba se realiza a diferentes presiones de trabajo. En cada uno de ellas los °Brix de la solución son iguales a los de la fruta.

Para este estudio se utilizaron 4 tipos de figuras geométricas (Fig. 11) para determinar cual de ellas presentaba una mejor porosidad efectiva. Dichas formas son:

1. Cubo : Tamaño = 1.2 cm³
2. Cilindro: Tamaño = 1 cm. diámetro x 2 cm. alto
3. Moneda: Tamaño = 2 cm. diámetro x 1 cm. alto
4. Aro: Tamaño = 4.5 cm. diámetro x 0.6 cm. alto



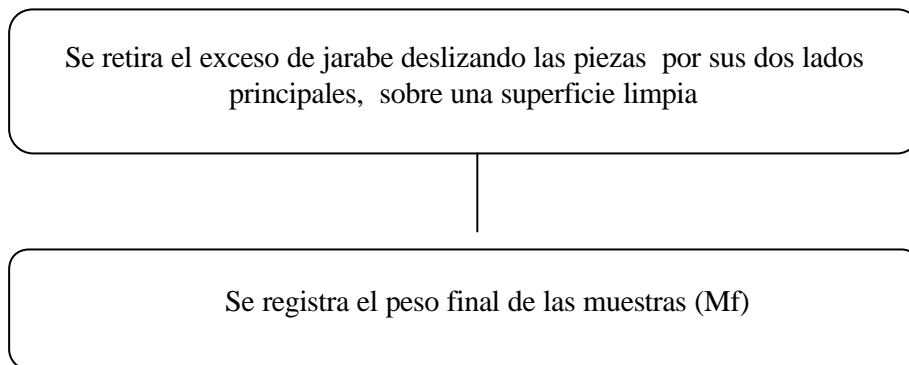


Fig 12 . Diagrama de flujo de la metodología experimental utilizada para la determinación de porosidad efectiva



Fig 13. Figuras geométricas utilizadas para la prueba de porosidad efectiva. Cubo, cilindro, moneda, aro.

En la Tabla IX se presentan las presiones utilizadas, así como cada una de las relaciones de compresión aparente para cada presión. Para cada presión de trabajo se calculan los parámetros: fracción volumétrica del líquido que ha penetrado en la muestra (X) y la fracción volumétrica ocupada por el líquido ($r-(1/r)$); donde se ajusta una línea recta cuya pendiente fue porosidad efectiva, en donde se despreció la penetración por capilaridad, efecto que se presenta cuando se está trabajando a presiones bajas, según el modelo simplificado de Fito y Pastor (1994)

$$X = \frac{(M_f - M_i)}{\rho_s V_{fruta}}$$

Donde:

M_f : peso final de la muestra (g)

M_i : peso inicial de la muestra (g)

ρ_s : densidad de la solución (g/cm³)

V_{fruta} : volumen de la fruta (cm³)

Tabla IX Condiciones de presión y relación de compresión utilizadas para evaluar la porosidad efectiva

Presión de vacío (mmHg)	Relación de compresión ($r = P_{atm} / P_{trabajo}$)
500	6.1
400	3.02
300	2.0
200	1.50

Presión atmosférica : 598 mmHg (en Cholula, Puebla)

3.6 Técnica de impregnación

Los microorganismos *Lactobacillus casei*, fueron obtenidos del Yakult, (leche fermentada). Se suspendió 210 ml de yakult en jugo de manzana de una marca comercial (Sonrisa), preparándose un total de 330 mL (obteniendo una relación 1:3 solución /fruta) para utilizar esta solución en la impregnación de aproximadamente 110 gramos de manzana.

Se cortaron las placas de manzana de dimensiones predeterminadas y se suspendieron en la solución. Se utilizó el mismo equipo que en la porosidad efectiva. Dicho tratamiento se realizó empleando una presión de máximo vacío constante de 500 mm Hg durante 10 min, continuando con un periodo de relajación de 10 min a presión

atmosférica y un tiempo de escurrimiento de 3 min. Se registró el peso para cuantificar la cantidad de solución impregnada en la muestra. La técnica de impregnación se muestra en el diagrama de la figura 15.

3.7 Conteo de microorganismos

Antes de cada impregnación se realizó el conteo de *Lactobacillus* del yakult, se hizo un recuento de la solución yakult-jugo de manzana, para saber cual era la cantidad de microorganismos en el medio de impregnación. Una vez realizada la impregnación se pesaron 10 g. de manzana en una bolsa estéril y se adicionaron 90 ml de agua peptonada al 0.1% triturando por 120 segundos a velocidad normal en un Stomacher. Posteriormente se hicieron las siembras sobre Agar MRS con un Autoplate 4000 Spiral Biotech (Fig 14), de la dilución 1×10^{-3} ufc/mL. Se dejaron incubar las placas al vacío por un periodo de 48 horas a 37°C. Transcurrido este tiempo se hizo el conteo de unidades formadoras de colonias (ufc/g).



Fig 14. Sembrador en espiral Autoplate 4000 Spiral Biotech,

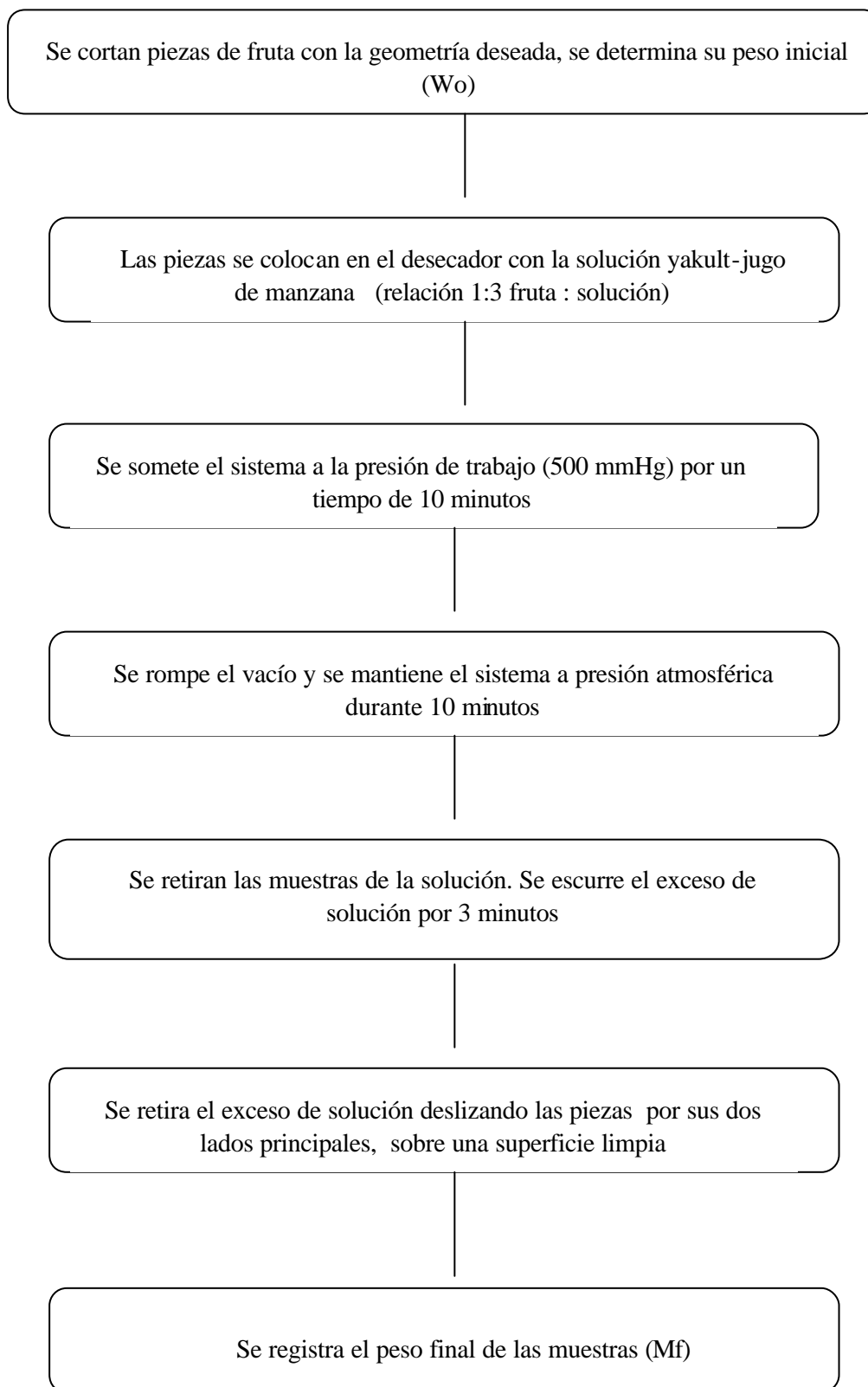


Fig 15. Diagrama de flujo de la metodología experimental utilizada para la impregnación al vacío.

3.8 Estabilidad del producto conservado y viabilidad del microorganismo

3.8.1 Liofilización

El primer método de conservación se realizó en un liofilizador industrial LABCONCO, el cual permitió mantener las muestras congeladas a -40°C y después se sublimó el agua a temperatura ambiente (25°C) sin ocasionar daño a la estructura de la fruta y sin afectar el número de microorganismo contenidos en la matriz, utilizando un vacío de 10 m de Hg. El tiempo de este proceso fue de 48 horas.

3.8.2 Secado con aire caliente

El segundo método de conservación consistió en secar la fruta impregnada en un secado de tunel. En dicho secador se realizaron las curvas de secado con dos temperaturas propuestas, (35°C y 40°C), así como diferentes tiempos 12, 14 y 20 horas con una velocidad de aire de 10 m/s .

3.8.3 Viabilidad del microorganismo

Se determinó la viabilidad del microorganismo en la fruta seca por los dos métodos, por medio de una rehidratación con jugo de manzana para todas las muestras impregnadas con *L. casei* tomando una relación 1:99 g fruta: mL de agua peptonada para realizar las diluciones de trabajo. Posterior a la rehidratación se realizó un conteo microbiológico de

las muestras con la dilución 10^{-3} , para cada tiempo de rehidratación y se sembró con el sembrador en espiral en agar MRS previamente solidificado.

Después de las 48 horas de incubación en estufa a 35 °C y en condiciones anaerobias, se hizo la lectura de las cajas para determinar las ufc/g de cada caja.

3.9 Evaluación sensorial

Se realizó una evaluación hedónica donde se le proporciono a casa juez una muestra de cada tipo de manzana secada, para que calificara el nivel de agrado de cada una. Se aplicó a 33 jueces no entrenados. El formato de la evaluación se encuentra en el Apéndice A. Los datos fueron analizados aplicando Análisis de Varianza (ANOVA) mediante el paquete estadístico MiniTAB 10.5 Xtra Power 1995.