

## CAPÍTULO VI

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 6.1 Materia Prima

Se empleó maracuyá variedad amarillo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) adquirido en la Central de Abastos de la Ciudad de México. La selección de la fruta se hizo en base a su estado de madurez, eliminado aquella que presentara deterioro físico, golpes y/o signos de deterioro microbiológico.

#### 6.2 Obtención de la pulpa de maracuyá (*Passiflora edulis f. flavicarpa*)

La fruta se lavó y peló, obteniendo la pulpa con semilla, posteriormente se refinó haciéndola pasar a través de un pulpeador (Speed-Trol, Stering Electric, Estados Unidos) a baja velocidad, cuidando el molido y la homogenización, para prevenir la actividad de la enzima pectinesterasa y evitar la gelación de la pulpa (Argaiz, 1995).

La pulpa de maracuyá se almacenó en bolsas de polietileno con sellado hermético con aproximadamente un kilogramo, y se congelaron a -40° C en una cámara de congelación (Sevco, Estados Unidos), manteniéndose así hasta su transformación en la bebida, previa descongelación de la pulpa (Argaiz & López-Malo, 1996).

### **6.3 Caracterización de la pulpa de maracuyá**

Se hicieron determinaciones por triplicado de pH, sólidos solubles, % de acidez,  $a_w$  y color antes de congelar la pulpa y después de la descongelación.

A la pulpa descongelada también se le determinaron: contenido de humedad, actividad de la enzima pectinesterasa, contenido de fibra dietética y flora nativa.

#### **6.3.1 Sólidos solubles**

Los sólidos solubles se expresaron como °Brix, se determinaron con un refractómetro digital Atago, a 25° C. Se colocó una gota jugo de maracuyá (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) en el refractómetro previa calibración del equipo con agua destilada, posteriormente se leyeron los °Brix por triplicado.

#### **6.3.2 pH**

Para la medición del pH se usó un potenciómetro digital (Orion 420-A, Estados Unidos), previa calibración del potenciómetro, se enjuagó el electrodo con agua destilada y se secó cuidadosamente, el potenciómetro se calibró con buffer pH 7 y buffer pH 4, posteriormente el electrodo se introdujo en la muestra y se leyó el pH, las determinaciones se hicieron por triplicado (Moreno, 2003).

#### **6.3.3 Acidez titulable**

La acidez titulable se determinó por triplicado por el método del AOAC (2000) 939.05. La acidez se realizó con la muestra diluida 1:1 de pulpa de maracuyá variedad amarillo y agua destilada. La determinación se hizo por titulación

con una solución valorada de hidróxido de sodio 0.1 N, se transfirieron 10 mL de la muestra a un matraz erlenmeyer y se adicionó 4 gotas de solución de fenoftaleína. Posteriormente se titulo la muestra hasta que se mantuvo el vire al color rosa por 1 minuto. La acidez titulable es expresada como porcentaje de ácido cítrico y es calculada por medio de:

$$\% \text{ acidez} = \frac{\text{g ácido X}}{100 \text{ mL muestra}} \quad (6.1)$$

$$\% \text{ acidez} = \frac{V_{\text{NaOH}} * N_{\text{NaOH}} * \text{meq ácido X} * 100}{V} \quad (6.2)$$

donde:  $V_{\text{NaOH}}$  = volumen de NaOH usado para la titulación,  $N_{\text{NaOH}}$  = normalidad del NaOH,  $\text{meq}_{\text{ácido X}}$  = miliequivalentes de ácido. Los valores equivalentes de base a ácido para el ácido cítrico es: 0.064.

#### **6. 3. 4 Actividad del agua**

La  $a_w$  se determinó en el equipo Aqua LabCX-2 Higrómetro de punto de rocío, (Decagon Devices Inc. Pullman, Washington, Estados Unidos) a 25° C, en una celda se colocó 1 mL de muestra y se hizo la lectura en el equipo (por triplicado) previa calibración del equipo con agua destilada (Horwitz, 1982).

#### **6. 3. 5 Contenido de humedad**

La determinación del contenido de humedad se hizo por triplicado en cajas petri a peso constante, se colocaron en cada una de ellas un peso conocido de muestra (7 gramos). Posteriormente se introdujeron las cajas en una estufa al vacío

(Cole- Parmer, modelo 005053- 10) a  $70^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ} \text{C}$  y a una presión no mayor de 20 in Hg de vacío, se mantuvieron ahí por 12 horas. El porcentaje de contenido de humedad de la muestra se determinó en base húmeda:

$$\% \text{ humedad} = \frac{W_{\text{final}} - W_{\text{charola + muestra}}}{W_{\text{muestra}}} * 100$$

donde:  $W_{\text{final}}$  = peso de la charola con la muestra después de 12 horas;  $W_{\text{charola + muestra}}$  = peso de la charola + muestra antes de introducir la charola a la estufa;  $W_{\text{muestra}}$  = peso de la muestra.

#### 6.4 Color

Se colocaron 10 mL de muestra en una celda de cuarzo y se realizaron las lecturas por triplicado, en el colorímetro Garder-colorgard System 05, en la escala reflectancia se determinaron los parámetros L, a y b en el sistema Hunter. A partir de las lecturas se calcularon los siguientes parámetros: diferencia de luminosidad ( $\Delta L$ ), diferencia neta de color ( $\Delta E$ ), tonalidad (H), claridad, croma o pureza de de color (C), definidas por:

$$H = \text{arc tan } b/a \quad (6.3)$$

$$C = (a^2 + b^2)^{0.5} \quad (6.4)$$

$$\Delta E = [(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2]^{0.5} \quad (6.5)$$

$$(\Delta L) = L_{\text{muestra}} - L_{\text{estándar}} \quad (6.6)$$

$$(\Delta a) = a_{\text{muestra}} - a_{\text{estándar}} \quad (6.7)$$

$$(\Delta b) = b_{\text{muestra}} - b_{\text{estándar}} \quad (6.8)$$

donde:  $L_{\text{estándar}}$ ,  $a_{\text{estándar}}$  y  $b_{\text{estándar}}$  son las lecturas de referencia de la muestra al tiempo cero.

## 6.5 Actividad enzimática de pectinesterasa

La determinación de la actividad de pectinesterasa se hizo empleando la técnica del pH estático (Argaiz, 1996).

### **Extracto enzimático:**

Se preparó una relación 1:1 de muestra y una solución extractora de NaCl 2M, (10 mL de muestra y 10 mL de solución de NaCl 2 M), se ajustó el pH a 7.5 con una solución de NaOH y se mantuvo a agitación constante por 1 hora en baño de hielo a una temperatura de 4° C.

### **Determinación de la actividad de la pectinesterasa (PE):**

Posteriormente se tomó una alícuota de 10 mL del extracto y se mezclaron con 10 mL de una solución de pectina cítrica al 1% en NaCl 1M, se ajustó el pH a 7.5 y se mantuvo en agitación constante por 30 minutos. Posteriormente se midió el

pH y se tituló la muestra con una solución de NaOH 0.0004 N hasta llegar nuevamente a pH 7.5.

La unidad de pectinesterasa (UPE) fue definida como número de miliequivalentes de éster hidrolizados por minuto y mililitro de muestra, a pH 7.5 y la actividad de la pectinesterasa se expresó como UPE/mL.

$$\frac{\text{UPE}}{\text{mL}} = \left( \frac{v * \frac{N}{1000}}{t * a} \right) * 10^6 \quad (6.9)$$

donde: v = volumen gastado de NaOH empleado para titular; N = normalidad de NaOH empleado para titular; t = tiempo de agitación; a = alícuota.

## 6.6 Determinación de ácido ascórbico

El ácido ascórbico (Vitamina C) se determinó (por triplicado) empleando el método del AOAC (2000) 976.22, por titulación con 2,6-diclorofenolindolfenol. 5 g de muestra se mezclan con 10 mL de una solución valorada de ácido metafosfórico-ácido acético, posteriormente se tituló con una solución de 2,6-diclorofenolindolfenol hasta el vire rosa que permanezca por lo menos durante 5 s, registrando el volumen empleado en la titulación para realizar los cálculos, el contenido de ácido ascórbico se expresa en mg AA/100g muestra.

## **6.7 Pruebas microbiológicas**

### **Flora nativa**

A la pulpa se le determinó la cuenta inicial de mesófilos aerobios, mohos y levaduras; la siembra se hizo a profundidad en agar nutritivo (Merck, Alemania) para el recuento de mesófilos aerobios y en agar papa dextrosa (Merck, Alemania) acidificado con ácido tartárico al 10 % (p/v), la siembra se realizó a partir de una dilución  $10^{-1}$  de la muestra en agua peptonada estéril (Merck, Alemania). Para mohos y levaduras las cajas se incubaron a 25° C por 48 h y para mesófilos aerobios se incubaron a 35° C por 48 h. Posteriormente se realizó el recuento de crecimiento de las colonias en el cuenta colonias Erma (Optical Works Ltd, Japón).

## **6.8 Fibra dietética: método gravimétrico-enzimático**

La determinación del contenido de fibra dietética se realizó siguiendo la metodología del AOAC (2000) 985.29. Para la determinación de fibra dietética las muestras fueron previamente secadas, por lo que las muestras se liofilizaron. Dos muestras de 1 g de muestras secas deshidratadas, se gelatinizaron con una  $\alpha$ -amilasa termoestable, posteriormente se hizo una digestión enzimática con proteasa y amiloglucosidasa para remover la proteína y el almidón. Se precipitó la fibra adicionando cuatro volúmenes de etanol.

El residuo total fue filtrado, lavado con etanol al 78%, etanol al 95% y acetona. Posteriormente el residuo se secó a 70° C por 12 h, después del secado, se

pesó el residuo. Posteriormente una muestra fue analizada para proteína empleando el método Kjeldahl y otra muestra fue incinerada a 525° C, y se determinaron las cenizas. La fibra dietética total (FDT) es igual a:

$$FDT = \left( \frac{\text{peso del residuo} - P - A}{\text{peso de la muestra}} \right) * 100 \quad (6.10)$$

donde: peso del residuo = promedio de los pesos (mg) para el duplicado de muestras determinadas; P y A = pesos (mg) de proteína y ceniza respectivamente en el primero y segundo residuos de las muestras; peso de la muestra = promedio de peso (mg) de las 2 muestras tomadas.

## **6.9 Estandarización de la bebida**

La estandarización del jugo de maracuyá se hizo a partir de la caracterización de la pulpa de maracuyá variedad amarillo, para obtener una formulación del jugo con las siguientes características: 25% de pulpa y 14.5° Brix empleando como edulcorante jarabe de fructosa. En el apéndice A se presentan los cálculos para la formulación del jugo.

## **6.10 Caracterización de la bebida**

Al jugo de maracuyá se le determinaron por triplicado, sólidos solubles (°Brix), pH, acidez titulable,  $a_w$ , color, contenido de ácido ascórbico (Vitamina C),



actividad de la enzima pectinesterasa, contenido de humedad, fibra dietética y flora nativa al jugo de maracuyá de acuerdo a los métodos descritos anteriormente.

### **6.11 Tratamiento térmico**

Empleando la técnica de Bigelow y Esty (1920), 10 mL de jugo se transfirieron a tubos de vidrio Pyrex (13.5 x 160 mm), posteriormente se colocaron en un baño termostado (Polytherm:Science/Electronics Dayton, Ohio Estados Unidos) a temperatura constante y se trataron térmicamente a cinco temperaturas diferentes: 70, 75, 80, 84 y 90° C, durante 7 periodos de tiempo: 0, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 minutos, posteriormente las muestras se enfriaron a -4° C.

La evolución de la temperatura de la muestra se registró con termopares tipo T colocados en el centro de los tubos conectados a un lector de temperatura digital (Cole Parmer Instrument Company, modelo 92000-00 Chigago, Illinois, Estados Unidos). Después de cada tratamiento térmico y en los períodos de tiempo se determinaron los cambios en la actividad enzimática de pectinesterasa, color, ácido ascórbico, empleando las metodologías anteriores. El tiempo cero se tomó cuando la muestra alcanzó la temperatura del tratamiento (Argaiz & López-Malo, 1996).

### **6.12 Determinación de las cinéticas de inactivación**

A partir de los datos obtenidos de la actividad enzimática de pectinesterasa, degradación de color y degradación de ácido ascórbico, se graficaron cada parámetro

por separado contra el tiempo y se hizo la determinación del tipo de orden de las cinéticas: orden cero o primer orden. Para las cinéticas de orden cero se graficó la diferencia del valor obtenido en el tiempo de tratamiento y el valor en el tiempo cero (C-Co) contra el tiempo. Para la cinética de primer orden se graficó el logaritmo natural de la fracción remanente ( $\ln(C/Co)$ ) en función del tiempo de tratamiento. Posteriormente se hizo una regresión lineal, el valor absoluto de la pendiente obtenida es la constante de velocidad de inactivación ( $k, \text{min}^{-1}$ ). A partir de  $k$  se calculó el parámetro  $D$ , con la siguiente ecuación:

$$D = \frac{2.303}{k} \quad (6. 11)$$

Lo anterior se hizo para cada temperatura.

#### **6. 12. 1 Obtención de z**

Con los valores de  $D$  obtenidos de cada parámetro se graficaron el logaritmo base 10 de los valores  $D$  contra la temperatura, el valor  $z$  es el inverso de la pendiente (Toledo, 1980).

#### **6. 12. 2 Cálculo de energía de activación**

La energía de activación ( $E_a$ ) de cada parámetro se calculó al graficar el logaritmo natural de la constante de velocidad de inactivación ( $k$ ) contra el inverso de la temperatura ( $1/T$ ) en grados Kelvin, aplicando la ecuación de Arrhenius:

$$\ln(k) = \frac{-E_a}{RT} + c \quad (6. 12)$$

donde  $R$  es la constante universal de los gases ( $1.987 \text{ Jmol}^{-1}\text{K}^{-1}$ ) y  $T$  es la temperatura en grados Kelvin.

### **6. 13 Determinación de los tiempos de inactivación térmica (TIT) de la enzima pectinesterasa**

Las muestras fueron tratadas térmicamente empleando el método de Bigelow y Esty (1920) a temperaturas de 80, 84, y 90° C y tiempos entre 1.5 y 2 veces el valor del parámetro  $D$  (determinado para la inactivación de la enzima pectinesterasa) a cada temperatura.

Empleando la técnica de Rostchild *et al.*, (1975), se determinaron los tiempos de inactivación térmica (TIT) de la actividad enzimática de la pectinesterasa. 30 mL de muestra tratada se mezclaron con 30 mL de solución de pectina al 0.05 %, el pH se ajustó a 7.5 con una solución de NaOH 0.1 N y se adicionaron 180 mL de agua destilada, se agregó 1.0 mL de  $\text{CaCl}_2$  1.0 N y 1 mL de tolueno y se incubó a 30° C por 48 h, posteriormente se determinó la viscosidad con un viscosímetro Brookfield DV-I (aguja H1 y 100 rpm).

Un control sin actividad enzimática fue preparado de la siguiente manera: la muestra se calentó a baño maría durante 20 minutos y posteriormente se aplicó la metodología antes mencionada.

La presencia de enzima activa en la muestra se indica como incremento en la viscosidad comparado contra el control. El tiempo de reducción decimal ( $D$ ) es el

tiempo necesario para alcanzar la inactivación enzimática sin cambio en la viscosidad a cierta temperatura.

#### **6. 14 Determinación del cambio sensorial en el jugo de maracuyá durante la aplicación del tratamiento térmico (Cinética de degradación de sabor)**

Para determinar el primer cambio de sabor en el jugo de maracuyá las muestras fueron tratadas térmicamente de 2 a 3 veces el valor  $D$  para la inactivación de la enzima pectinesterasa, en incrementos de 0.5  $D$ . Las muestras fueron evaluadas por un panel de jueces empleando una prueba discriminativa triangular, la prueba determina la existencia o no de diferencias respecto a la muestra diferente, al juez se le presentaron tres muestras y se le pidió que señalara la muestra diferente al probar las tres. El juez anotó el número de la muestra distinta en un formulario (Apéndice B). Con los resultados obtenidos se calculó el valor  $D$  el cual fue definido como el tiempo del tratamiento térmico necesario a cierta temperatura para producir un cambio en el sabor.

#### **6. 15 Curvas de Penetración de Calor**

Las curvas de penetración de calor se obtuvieron empleando los datos de temperatura, obtenidos durante los tratamientos térmicos. Posteriormente se determinaron los tratamientos térmicos óptimos que dan el valor  $F$  requerido, sobre la base de los valores  $D$  y  $z$  para la inactivación de la enzima pectinesterasa y la degradación del ácido ascórbico (Bigelow et al., 1920) y el método de la fórmula (Ball, 1923).

### **6. 16 Efectividad del tiempo de subida de la temperatura (CUT)**

Se determinó el efecto del tiempo de subida de la temperatura a partir de los datos de penetración de calor empleando el método reportado por Nath & Ranganna (1977).

### **6. 17 Optimización del proceso de pasteurización**

Se graficaron los logaritmos de los tiempos de tratamiento para la inactivación térmica de la enzima, degradación de ácido ascórbico contra la temperatura y se encontraron los tratamientos térmicos óptimos, con el propósito de conservar atributos sensoriales y nutricionales e inactivar a la enzima pectinesterasa (Moreno, 2003).

### **6. 18 Formulación de la bebida funcional**

Se siguió la formulación empleada para la estandarización del jugo de maracuyá (Apéndice A), las fibras dietéticas solubles empleadas fueron inulina (Raftilose GR) y oligofruktuosa (Raftilose P95), de acuerdo con la hoja técnica la inulina contiene > 90 % de fibra dietética soluble y la oligofruktuosa contiene > 93.2 % de fibra dietética soluble.

Se adicionaron las siguientes cantidades de fibra para tener un 100 % de fibra dietética soluble en 2.5 g/ 250 mL:

2.5 g de inulina → 100 % fibra dietética soluble

**X = 2.77 g de inulina** → 90 % fibra dietética soluble

Para la oligofruktuosa:

2.5 g de oligofruktuosa → 100 % fibra dietética soluble

**X = 2.68 g de oligofruktuosa** → 93.2 % fibra dietética soluble

Por lo tanto se adicionaron 2.77 g oligofruktuosa /250 mL ó 2.68 g inulina/250 mL al jugo de maracuyá.

#### **6.19 Tratamiento térmico a la bebida funcional de maracuyá**

Empleando la técnica de Bigelow y Esty (1920), 10 mL de jugo se transfirieron a tubos de vidrio Pyrex (13.5 x 160 mm), posteriormente se colocaron en un baño termostado (Polytherm:Science/Electronics Dayton, Ohio Estados Unidos) a temperatura constante y se trataron térmicamente a 90° C por 14 minutos.

#### **6.20 Determinación de degradación de fibra dietética soluble**

Después del tratamiento térmico se determinó la degradación de la fibra dietética soluble empleando la metodología mencionada anteriormente.