UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

FACULTAD DE CIENCIAS AGROALIMENTARIAS

ESCUELA DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Trabajo Final de Graduación bajo la modalidad de Proyecto de Investigación presentado a la Escuela de Tecnología de Alimentos para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos

Mejoramiento del proceso de extracción de jugo de zanahoria en una empresa procesadora de frutas y vegetales mediante la implementación de un tratamiento enzimático optimizado

Elaborado por:

Marianne Kopper Batalla

Carné: A52960

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio

Abril 2012

TRIBUNAL EXAMINADOR

Proyecto de graduación presentado a la Escuela de Tecnología de Alimentos como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos.

Elaborado por:

Marianne Kopper Batalla

Aprobado por:

M.Sc. Jacqueline Aiello Ramírez
Presidenta del Tribunal

Dra. Ana Mercedes Pérez Carvajal
Directora del Proyecto

Ing. Eduardo Thompson Vicente
Asesor del Proyecto

Lic. Marvin Soto Retana
Asesor del Proyecto

M.Sc. Alicia Hernández Peñaranda
Profesora Designada

DEDICATORIA

A Dios, por darme la fortaleza para seguir adelante y ponerme retos en mi camino

Muy especialmente a mi padre, por su amor, apoyo y motivación incondicional

A mi madre por su amor y apoyo incondicional

AGRADECIMIENTOS

Al Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos y al Centro Nacional de Innovaciones Biotecnológicas, por el apoyo científico y financiero brindado para la realización del presente proyecto de investigación.

Al Grupo Trisan, por el apoyo en el suministro de muestras de preparados enzimáticos.

A la industria involucrada, por el apoyo e interés mostrado a lo largo del proyecto. Especialmente a Bernal, Marvin y Alejandra; y a Luis, por su valiosa ayuda en las pruebas en planta.

A Ana Mercedes, por su dedicación, guía y apoyo incondicional durante todas las etapas del proyecto, y por sus valiosas observaciones que enriquecieron mi trabajo.

A mis asesores, Eduardo y Marvin por su disposición y apoyo durante la realización del proyecto.

A Rocío, por su invaluable ayuda como asistente.

A los funcionarios del CITA y de la Escuela de Tecnología de Alimentos que de uno u otra forma colaboraron en el desarrollo de este proyecto. Particularmente al personal de los laboratorios de química y a Alonso por el soporte en la realización de las pruebas en planta piloto.

A Óscar, por su guía y sus consejos durante los años de carrera.

A mis amigos y compañeros, especialmente a Adriana, Catalina, Marilyn, Marianne, Pamela, Hazel, Margarita y Marvin, por su incondicional apoyo durante los años de carrera.

A mi madre, mi padre y mis hermanas Ilse y Amanda, por el apoyo que me han brindado durante toda mi vida y especialmente durante los años de carrera y la realización de mi proyecto final de graduación.

A Daniel, por su incondicional cariño, apoyo y comprensión.

ÍNDICE GENERAL

Tribunal examinador ii

Dedicatoria iii

Agradecimientos iv

Índice general v

Índice de cuadros viii

Índice de figuras xi

Abreviaturas xii

Resumen xiv

I. Justificación 1

II. Objetivos 6

2.1 Objetivo general 6

2.2 Objetivos específicos 6

III. Marco teórico 7

3.1 generalidades de la zanahoria 7

3.1.1 Situación en Costa Rica y el mundo 7

3.1.2 Principales componentes nutricionales 7

3.1.3 Procesamiento 13

3.2 Proceso de producción de jugo de frutas y de vegetales 14

3.2.1 Tratamientos enzimáticos 15

3.3 Parámetros de calidad en jugos de frutas y de vegetales 20

3.4 Optimización de procesos 21

3.4.1 Metodología de superficie de respuesta 21

IV. Materiales y métodos 23

4.1 Localización del proyecto 23

4.2 Materia prima 23

4.3 Preparados enzimáticos 24

4.4 Pruebas experimentales 24

4.4.1 Caracterización del proceso convencional de fabricación de jugo de zanahoria a nivel industrial 24

4.4.2 Selección del preparado enzimático más adecuado para maximizar el rendimiento de extracción de jugo de zanahoria a nivel de laboratorio 26

4.4.3 Optimización de las condiciones de tratamiento enzimático para la extracción de jugo de zanahoria a nivel de laboratorio..... 31

4.4.4 Comparación de dos temperaturas de tratamiento enzimático sobre la extracción de jugo de zanahoria 35

4.4.5 Implementación del proceso que involucra el tratamiento enzimático óptimo para la extracción de jugo de zanahoria a nivel de planta piloto.....36

4.4.6 Implementación del proceso que involucra el tratamiento enzimático óptimo para la extracción de jugo de zanahoria a nivel industrial 37

4.5 Métodos de análisis físico-químicos 41

4.5.1 Determinación del rendimiento de extracción de jugo 41

4.5.2 Determinación de sólidos solubles 41

4.5.3 Determinación de pH 41

4.5.4 Determinación de sólidos insolubles en suspensión 41

4.5.5 Determinación de turbidez 41

4.5.6 Determinación de estabilidad relativa a la turbidez.....42

4.5.7 Determinación de color 42

4.5.8 Determinación de humedad 43

4.5.9 Determinación de carotenoides totales 43

4.5.10 Determinación de proteína.....45

4.5.11 Determinación de lípidos.....45

4.5.12 Determinación de cenizas.....45

4.5.13 Determinación de carbohidratos totales 45
4.5.14 Determinación de fibra dietética 45
4.5.15 Determinación de carbohidratos disponibles.....46
4.5.16 Determinación de acidez titulable 46
4.5.17 Determinación de polifenoles totales 46
4.5.18 Determinación de azúcares totales.....46
4.5.19 Determinación de capacidad antioxidante.....46
4.5.20 Condiciones de almacenamiento de las muestras 46
4.5.21 Número de réplicas realizadas para cada análisis 46
V. Resultados y discusión.....47
5.1 caracterización del proceso convencional de fabricación de jugo de zanahoria a nivel industrial.....47
5.2 Selección del preparado enzimático más adecuado para maximizar el rendimiento de extracción de jugo de zanahoria a nivel de laboratorio 54
5.3 Optimización de las condiciones del tratamiento enzimático para la extracción de jugo de zanahoria a nivel de laboratorio.....64
5.4 Comparación del rendimiento de extracción de jugo de zanahoria a nivel de laboratorio a dos termperaturas de tratamiento enzimático: 25 y t1 °C 83
5.5 implementación del proceso que involucra el tratamineto enzimático óptimo para la extracción de jugo de zanahoria a nivel de planta piloto E INDUSTRIAL..... 86
VI. Conclusiones Y recomendaciones.....94
6.1 Conclusiones 94
6.2 Recomendaciones 95
VII. Bibliografía 96
VIII. Anexos.....107

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro I. Funciones biológicas de los carotenoides.....9

Cuadro II. Características principales de los preparados enzimáticos utilizados con el fin de incrementar el rendimiento de extracción de jugo de zanahoria. 24

Cuadro III. Tratamientos evaluados para la selección del preparado enzimático más adecuado para maximizar el rendimiento de extracción de jugo de zanahoria nivel de laboratorio. 27

Cuadro IV. Variables y niveles para el diseño central compuesto rotable empleado para optimizar las condiciones de tratamiento enzimático para la extracción de jugo de zanahoria. 32

Cuadro V. Matriz del diseño central compuesto rotable empleado para optimizar las condiciones de tratamiento enzimático para la extracción de jugo de zanahoria.....33

Cuadro VI. Tratamientos evaluados para la comparación de dos temperaturas de tratamiento enzimático sobre la extracción de jugo de zanahoria. 35

Cuadro VII. Composición proximal de la zanahoria empleada como materia prima y del jugo de zanahoria fabricado a nivel industrial mediante el proceso convencional. 47

Cuadro VIII. Propiedades físicas y químicas de la zanahoria empleada como materia prima y del jugo de zanahoria fabricado a nivel industrial mediante el proceso convencional. 50

Cuadro IX. Porcentaje de rendimiento del proceso de extracción de jugo de zanahoria fabricado a nivel industrial mediante el proceso convencional.....53

Cuadro X. Evaluación del rendimiento de extracción de jugo de zanahoria a nivel de laboratorio y algunas características físicas y químicas de este, en función de la aplicación o no de un proceso enzimático empleando distintos preparados (pH1, concentración de enzimas 200 ppm, tiempo de incubación 60 min y temperatura de incubación T1 °C). 55

Cuadro XI. Precio de los diferentes preparados enzimáticos utilizados. 63

Cuadro XII. Influencia de la concentración del preparado enzimático P1 y del tiempo de incubación a una temperatura de T1, en el rendimiento de extracción y algunas características físicas y químicas de jugo de zanahoria tratado enzimáticamente a nivel de laboratorio según un diseño central compuesto rotable. 65

Cuadro XIII. Efectos y niveles de significancia (p)[a] de la concentración de preparado enzimático y del tiempo de incubación, en el rendimiento de extracción de jugo, el pH y el contenido de sólidos solubles (°Brix) de jugo de zanahoria tratado enzimáticamente a nivel de laboratorio según un diseño central compuesto rotable. 66

Cuadro XIV. Efectos y niveles de significancia (p)[a] de la concentración de preparado enzimático y del tiempo de incubación, en el contenido de sólidos insolubles en suspensión y la turbidez de jugo de zanahoria tratado enzimáticamente a nivel de laboratorio según un diseño central compuesto rotable.....70

Cuadro XV. Efectos y niveles de significancia (p)[a] de la concentración de preparado enzimático y del tiempo de incubación, en los parámetros de color de jugo de zanahoria tratado enzimáticamente a nivel de laboratorio según un diseño central compuesto rotable. 75

Cuadro XVI. Efectos y niveles de significancia (p)[a] de la concentración de preparado enzimático y del tiempo de incubación, en el contenido de carotenoides totales y sólidos totales de jugo de zanahoria tratado enzimáticamente a nivel de laboratorio según un diseño central compuesto rotable.....76

Cuadro XVII. Condiciones de proceso óptimas para maximizar el rendimiento de extracción y minimizar el contenido se sólidos insolubles en suspensión y la turbidez en jugo de zanahoria tratado enzimáticamente a nivel de laboratorio, utilizando el preparado enzimático P1 y empleando una temperatura de incubación de T1 °C..... 81

Cuadro XVIII. Respuestas predichas y observadas para las condiciones de proceso óptimas para la extracción de jugo de zanahoria a nivel de laboratorio, utilizando el preparado enzimático P1 y una temperatura de incubación de T1 °C..... 81

Cuadro XIX. Respuestas predichas y observadas para una combinación de condiciones de proceso seleccionadas para la extracción de jugo de zanahoria a nivel de laboratorio, utilizando el preparado enzimático P1 y una temperatura de incubación de T1 °C. 82

Cuadro XX. Evaluación del rendimiento de extracción de jugo de zanahoria a nivel de laboratorio y de algunas características físicas y químicas este, en función de la temperatura de tratamiento enzimático empleando el preparado P1 en una concentración de C1 ppm y un tiempo de incubación de X1 min..... 84

Cuadro XXI. Evaluación del rendimiento de extracción de jugo de zanahoria fabricado a escala de planta piloto y de laboratorio, mediante la aplicación de un tratamiento enzimático con P1 en una concentración de C1 ppm, con un tiempo de incubación de X1 min y una temperatura de T1 °C 87

Cuadro XXII. Evaluación del rendimiento de extracción de jugo de zanahoria y algunas características físicas y químicas del producto fabricado a nivel industrial, mediante la aplicación de un tratamiento enzimático con P1 en una concentración de C1 ppm, con un tiempo de incubación de X1 min y una temperatura de T1±1 °C; y mediante el proceso convencional. 88

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del β-caroteno. 10

Figura 2. Modo general de acción de las enzimas poligalacturonasas. 17

Figura 3. Modo general de acción de las enzimas liasas 18

Figura 4. Modo general de acción de las enzimas pectinesterasas. 18

Figura 5. Flujo de proceso general para la elaboración de jugo de zanahoria a nivel industrial mediante el proceso convencional 25

Figura 6. Flujo de proceso para la elaboración de jugo de zanahoria tratado enzimáticamente a nivel de laboratorio. 30

Figura 7. Flujo de proceso general para la elaboración de jugo de zanahoria mediante el proceso convencional y tratado enzimáticamente a nivel industrial. 39

Figura 8.Composición química de la zanahoria empleada como materia prima y del jugo de zanahoria fabricado a nivel industrial mediante el proceso convencional, expresada en base seca 48

Figura 9. Efecto de la concentración de preparado enzimático y del tiempo de incubación en el rendimiento de extracción (% m/m) de jugo de zanahoria tratado enzimáticamente a nivel de laboratorio a T1 °C 68

Figura 10. Efecto de la concentración de preparado enzimático y del tiempo de incubación en el contenido de sólidos insolubles en suspensión (% m/m) de jugo de zanahoria tratado enzimáticamente a nivel de laboratorio a T1 °C. 72

Figura 11. Efecto de la concentración de preparado enzimático y del tiempo de maceración en la turbidez (NTU) de jugo de zanahoria tratado enzimáticamente a nivel de laboratorio a T1 °C. 73

Figura 12. Efecto de la concentración de preparado enzimático y del tiempo de incubación en la el contenido de carotenoides totales de jugo de zanahoria tratado enzimáticamente a nivel de laboratorio a T1 °C 78

Figura 13. Optimización de las condiciones de tratamiento enzimático para la extracción de jugo de zanahoria a nivel de laboratorio en función del rendimiento de extracción (conveniencia máxima), el contenido de sólidos insolubles en suspensión y la turbidez (conveniencia mínima). 79

ABREVIATURAS

α	Alfa
A	Absorbancia
ANDEVA	Análisis de varianza
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
β	Beta
C*	*Chroma*
cm	Centímetros
DCCR	Diseño central compuesto rotable
º	Grados
°C	Grados Celsius
g	Gramos
h	Horas
Hº	*Hue*
kg	Kilogramos
L	Litros
L*	Luminosidad
LPO	Lipooxigenasa
kPa	Kilo Pascales
m^3	Metros cúbicos
min	Minutos
mL	Mililitros
mm/s	Milímetros/segundo
MSR	Metodología de superficie de respuesta
N	Newton
nm	Nanómetros
NTU	Unidades Nefelométricas de Turbidez
ORAC	*Oxygen radical absorbance capacity*
P	Probabilidad
P_{fa}	Probabilidad de falta de ajuste
PECTU	Unidades enzimáticas de pectinasa
PGU	Unidades enzimáticas de poligalacturonasa
ppm	Partes por millón

% (m/m)	Porciento masa/masa
%	Porciento
R^2	Coeficiente de correlación
rpm/rcf	Revoluciones por minuto/fuerza centrífuga relativa
s	Segundos
U	Unidades enzimáticas
µg	Microgramos

RESUMEN

Se implementó un tratamiento enzimático en condiciones de tiempo de incubación y concentración de preparado enzimático óptimas, como una operación efectiva en el proceso convencional de elaboración de jugo prensado de zanahoria en una industria procesadora de frutas y vegetales, con el fin de incrementar el rendimiento de extracción.

Para ello, a nivel de laboratorio, se seleccionó a partir de tres preparados enzimáticos comerciales, el más adecuado para maximizar el rendimiento de extracción de jugo. Posteriormente se evaluaron los parámetros de proceso: tiempo de incubación y concentración de preparado enzimático utilizando la metodología de superficie de respuesta, para maximizar el rendimiento de extracción y minimizar el contenido de sólidos insolubles en suspensión y la turbidez, parámetros de calidad importantes establecidos por la empresa. Adicionalmente, otros parámetros físico-químicos del jugo, entre ellos el contenido de carotenoides totales, fueron evaluados. Además, se comparó el rendimiento de extracción de jugo y otras características físico-químicas de este, al realizar el tratamiento enzimático a 25 °C y T1 °C en las condiciones de proceso óptimas definidas. Finalmente, el tratamiento enzimático en condiciones óptimas a T1 °C fue implementado en la industria.

P1 fue seleccionado como el preparado enzimático más adecuado para maximizar el rendimiento de extracción de jugo de zanahoria a nivel de laboratorio. Una concentración de C1 ppm y un tiempo de incubación de X1 min (a una temperatura definida de T1 °C) correspondieron a las condiciones óptimas de operación. En dichas condiciones de proceso, mediante la implementación del tratamiento enzimático acoplado a una etapa de acidificación de la zanahoria durante la molienda (hasta pH1), fue posible aumentar el rendimiento de extracción de jugo a escala industrial en un 17 % con respecto al proceso convencional. Adicionalmente, se logró disminuir el contenido de sólidos insolubles en suspensión y la turbidez del jugo, así como mejorar el color y la estabilidad a la turbidez; sin embargo, el contenido de carotenoides totales disminuyó en un 35 %. El jugo tratado enzimáticamente se obtuvo a nivel industrial con un rendimiento de 90±1 % (m/m), presentó un pH de 4,19; 7,8 °Brix; 11±4 % (m/m) de sólidos insolubles en suspensión; una turbidez de 5719±496 NTU; 62±8 μg β-caroteno/g de jugo (carotenoides totales) y un 8 % de estabilidad relativa a la turbidez.

I. JUSTIFICACIÓN

La zanahoria (*Daucus carota L.*) es un vegetal originario del centro de Asia y del Mediterráneo, que ha sido cultivado y consumido desde la antigüedad por los griegos y romanos. Su cultivo ha experimentado un importante crecimiento en los últimos años y es un vegetal de raíz muy importante alrededor de todo el mundo, el segundo después de la papa (Cámara Agropecuaria y Agroindustrial de El Salvador, 2005; Sharma *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2006).

Nutricionalmente, la zanahoria se caracteriza por ser un vegetal rico en compuestos naturales bioactivos, específicamente en carotenoides, dentro de los cuales el β-caroteno constituye la fracción sobresaliente. Estos compuestos tienen acciones biológicas diversas, sin embargo, la función que está mejor documentada y establecida es su actividad de pro-vitamina A (precursor de vitamina A), en especial del β-caroteno. La zanahoria es una buena fuente de vitamina A (cuya deficiencia es un problema extendido en los países en desarrollo) y de algunos minerales, mayoritariamente potasio, sodio, fósforo y calcio; además, se caracteriza por su alto contenido de agua y baja proporción de lípidos y proteínas (van den Berg *et al.*, 2000; Cámara Agropecuaria y Agroindustrial de El Salvador, 2005; Sharma *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2006; USDA, 2010).

Se ha establecido que la ingesta de carotenoides directamente de las frutas y los vegetales es segura y beneficiosa para la salud humana; en contraste, para los suplementos de β-caroteno se ha establecido que la dosis de consumo diario no debe ser mayor a 2 mg (Sun *et al.*, 2006). Se ha determinado incluso, que su función como antioxidantes en las plantas muestra un interesante paralelismo con su rol potencial como antioxidantes en alimentos y en humanos. Entre otras funciones biológicas que se les han atribuido a estos compuestos, destacan las relacionadas con la comunicación celular y la función inmunológica; asimismo, existe evidencia de que la ingesta de carotenoides se relaciona con una menor incidencia de enfermedades degenerativas (van den Berg *et al.*, 2000).

En términos generales, una gran proporción de las frutas y los vegetales cosechados anualmente es procesada en una amplia variedad de productos; en el caso de los jugos de frutas y de vegetales, se establece que la producción mundial es realmente importante (van den Berg *et al.*, 2010; Ceci & Lozano, 2010). Específicamente para la zanahoria, a nivel industrial destaca la producción de jugo, el cual según se reporta, es de los productos

elaborados a partir de zanahoria mayormente aceptados por el consumidor y al cual se le atribuyen diversas propiedades medicinales (Sharma *et al.*, 2005).

En el caso de Costa Rica, la producción de jugos y concentrados de frutas para exportación es importante y creciente. Tanto para el año 2009 como para el 2010, se reportó que estos alimentos correspondieron al segundo producto principal de exportación de la industria alimentaria, representando para el 2009 una suma de 157,3 millones de dólares, con un aumento del 17,9 % con respecto al año anterior; y para el 2010, 147,8 millones de dólares con una disminución de -6.1 % con respecto al año 2009 (PROCOMER, 2010).

El proceso convencional de elaboración de jugo de zanahoria generalmente involucra una operación unitaria de reducción de tamaño, que facilita la extracción del jugo, y un posterior prensado mecánico del macerado para separar la fase líquida de las partículas grandes insolubles (Sharma *et al.*, 2005; van den Berg *et al.*, 2010), seguidos comúnmente de una etapa de pasteurización y de concentración del producto (Ceci & Lozano, 2010). A partir de este proceso, se obtiene un jugo turbio y un residuo con un alto contenido de sólidos, rico en fibra dietética y en compuestos bioactivos. Este residuo, difícilmente es utilizado en la fabricación de alimentos y, por lo general, se utiliza para alimentación animal o se desecha (Sharma *et al.*, 2005).

Es por esto, que en los procesos modernos para la producción de jugos de frutas y de vegetales, se considera esencial el uso de enzimas como coadyuvantes para la desintegración de las pulpas. El empleo de preparados enzimáticos permite aumentar el rendimiento de extracción de jugo, y el contenido de sólidos solubles y de compuestos bioactivos, mejorar la calidad aromática del producto y reducir la turbidez, el tiempo de procesamiento, los problemas de filtrado y el volumen de residuos (Sharma *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2007; Ceci & Lozano, 2010).

En este marco, el presente proyecto propone la mejora del proceso de producción de jugo de zanahoria en una industria procesadora de frutas y de vegetales, mediante la implementación de un tratamiento enzimático en condiciones de proceso óptimas. Esto es de gran importancia, pues a partir del proceso mejorado, se espera que sea posible reducir los costos de procesamiento y aumentar la sostenibilidad del proceso, al disminuir la cantidad de energía mecánica necesaria para la extracción del jugo, incrementar el rendimiento y reducir el volumen de desechos generados (van den Berg *et al.*, 2010).

Actualmente en Costa Rica rige la Ley para la Gestión Integral de los Residuos (No. 8839, decretada en mayo del 2010) (ver Anexo 7), la cual, como principio general responsabiliza a las industrias generadoras de desechos del manejo integral y sostenible de los mismos, así como también establece que estas deben prevenir la generación de residuos en cualquier actividad que realicen o en su defecto, reducir al máximo la generación de estos en su origen. En el marco de esta ley, el presente proyecto fomenta el uso de una alternativa de producción más limpia para la fabricación de jugo de zanahoria, por medio de la integración de una estrategia que minimiza la cantidad de residuos generados.

Asimismo, mediante la aplicación de un tratamiento enzimático se pretende lograr un aumento en el contenido de sólidos solubles y en la intensidad del color del jugo, parámetros de calidad establecidos por la industria para el producto terminado. Otro de los efectos esperados como resultado del uso de enzimas es el incremento en el contenido de pigmentos carotenoides, los cuales correlacionan linealmente con la tonalidad del color rojo en el jugo y además, desempeñan un papel crucial en la definición de los parámetros de calidad de las frutas, los vegetales y sus productos derivados (van den Berg *et al.*, 2000; Dinnella *et al.*, 2000). Todo lo anterior sin producir efectos adversos en la calidad del jugo (Novozymes, 2001).

Durante la aplicación de tratamientos enzimáticos en las industrias con el fin de maximizar el rendimiento de extracción de jugos, pueden ocurrir pérdidas debido a que se conoce poco el efecto real de las condiciones del tratamiento aplicado sobre el rendimiento y la aceptación general del producto (Sharma *et al.*, 2006). En esto radica la importancia de encontrar, mediante la selección adecuada de un preparado enzimático y la optimización de los parámetros de proceso para el tratamiento enzimático, las condiciones idóneas para la extracción de jugo de zanahoria a nivel industrial.

Es reconocido que varios factores influyen durante el tratamiento enzimático de una fruta o un vegetal cuando se produce un jugo, los cuales tienen efectos totales y combinados sobre las respuestas evaluadas (rendimiento, viscosidad, entre otras). Diversas investigaciones indican que esta etapa está influenciada por el tipo de preparado enzimático y su concentración, el tiempo y la temperatura de incubación (Sharma *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2006). Según estudios realizados en jugo de zanahoria, los efectos más pronunciados en la maceración enzimática

son producto de la temperatura y la concentración de las enzimas adicionadas (Chadha *et al.*, 2003).

Actualmente, la utilización de enzimas en el procesamiento de frutas y de vegetales se ha convertido en un factor importante, por lo que hoy en día existe en el mercado un número considerable de preparados enzimáticos para este uso en específico (van den Berg *et al.*, 2010; Ceci & Lozano, 2010).

Según Ceci & Lozano (2010), las pectinasas entre otras enzimas, son parte importante de la tecnología de producción de jugos. Específicamente en la fabricación de jugo de zanahoria, con el fin de obtener mayor rendimiento y mayor cantidad de β-caroteno, se usan este tipo de enzimas, las cuales al romper las pectinas facilitan la separación del jugo y la liberación de β-caroteno, reduciendo además la viscosidad del jugo (Sun *et al.*, 2006). Se ha encontrado también, que los tratamientos con enzimas celulasas y pectinasas en conjunto, pueden aumentar significativamente el rendimiento de extracción de jugo y de sólidos solubles (Landbo *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2007).

Sin duda alguna, la utilización de enzimas en el procesamiento de frutas y de vegetales ha sido bien aceptada y estudiada (van den Berg *et al.*, 2010). Específicamente la aplicación de tratamientos enzimáticos para la fabricación de jugo de zanahoria ha sido abordada por varios autores, entre ellos Dinnella *et al.* (2000), Reiter *et al.* (2003), Qin *et al.* (2005), Liao *et al.* (2007) y Demir *et al.* (2007). Vandana & Das Gupta (2006), Sun *et al.* (2006), Sharma *et al.* (2005) y Chadha *et al.* (2003), estudiaron propiamente la optimización de tratamientos enzimáticos en pulpa de zanahoria utilizando la metodología de superficie de respuesta.

Los beneficios que posee la optimización de las condiciones de proceso utilizando la metodología de superficie de respuesta, radican en que este diseño experimental permite optimizar una variable respuesta que está influenciada por diversas variables independientes, e incluso analizar los efectos de interacción entre ellas, representando así el efecto neto de los parámetros evaluados sobre las respuestas de interés. Esto permite determinar, a partir de pocas pruebas experimentales, los niveles de los factores del diseño en los cuales la respuesta alcanza el óptimo (Sun *et al.*, 2006; Raissi & Farsani, 2009). En el caso del presente proyecto, el tiempo de incubación y la concentración del preparado enzimático fueron los factores evaluados.

El hecho de que se requieran pocos tratamientos conlleva a minimizar los costos de las pruebas experimentales, relacionados principalmente con el uso de los preparados enzimáticos, lo cual permite realizar una eficiente selección y optimización de los parámetros de proceso (Sharma *et al.*, 2005).

Una vez obtenidas las condiciones óptimas del tratamiento enzimático a nivel de laboratorio, el siguiente paso consistió en realizar pruebas a nivel de planta piloto, etapa previa a la implementación de la nueva operación unitaria dentro del proceso de producción actual de jugo de zanahoria a nivel industrial. Scott *et al.* (s.f.) mencionan que el escalamiento de un producto alimenticio es un proceso emocionante y desafiante, que requiere para su éxito un enfoque organizado, flexible y consistente.

La realización de pruebas a nivel de planta piloto es importante debido a que es usual que los alimentos se comporten de manera distinta en pequeña y gran escala, lo cual conlleva a obtener lotes de productos con características muy diferentes cuando se realizan las primeras pruebas a nivel industrial. Generalmente se requiere modificar la fórmula para que se asemeje más a la original, pero está establecido que no es posible obtener un producto idéntico, debido a que los alimentos son matrices complejas en los que interactúan sistemas físicos y químicos. Dado lo anterior, se dice que el proceso de escalamiento de un producto no necesariamente es sencillo, este se realiza a prueba y error y puede requerir de varios intentos para ser exitoso (Scott *et al.*, s.f.).

Se considera que los grandes cambios en el equipo de proceso que se requiere para implementar el tratamiento enzimático en un jugo producido a escala industrial, y los aspectos relacionados con el traslado del producto de una etapa a otra en el proceso, son los mayores retos que se afrontarán durante la implementación del proceso a nivel industrial. La realización de pruebas a nivel piloto, se considera necesaria para lograr una implementación eficiente y reducir al mínimo necesario la cantidad de pruebas a realizar en la industria.

Con ello se espera afectar lo menos posible la productividad de la línea, logrando finalmente el objetivo del proyecto, el cual consiste en evaluar en una primera etapa el efecto de las condiciones del tratamiento enzimático (tiempo de incubación y concentración de preparado enzimático) en el rendimiento de extracción de jugo y sus características físico-químicas. Y posteriormente optimizar dichas condiciones para maximizar el rendimiento de extracción y minimizar el contenido de sólidos insolubles en suspensión y la turbidez del producto.

II. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Aumentar el rendimiento del proceso extracción de jugo de zanahoria en una industria procesadora de frutas y vegetales mediante la implementación de un tratamiento enzimático en condiciones óptimas de tiempo de incubación y concentración de preparado enzimático.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar el proceso convencional de extracción de jugo de zanahoria en la industria mediante la cuantificación del rendimiento de extracción de jugo y la determinación de algunas características físico-químicas de la materia prima y el producto terminado.
- Seleccionar a partir de tres preparados enzimáticos comerciales, el más adecuado para maximizar el rendimiento de extracción de jugo de zanahoria a nivel de laboratorio.
- Optimizar los parámetros de proceso (tiempo de incubación y concentración de preparado enzimático) para el tratamiento enzimático de pulpa de zanahoria a nivel de laboratorio, en función del rendimiento de extracción de jugo y de algunas características físico-químicas de este, utilizando el preparado enzimático seleccionado como más adecuado.
- Comparar el rendimiento de extracción de jugo y algunas características físico-químicas de este, al realizar el tratamiento enzimático de pulpa de zanahoria bajo las condiciones óptimas de tiempo de incubación y concentración de preparado enzimático, a 25 y T1 °C, donde T1 °C es mayor que 25 °C.
- Implementar el tratamiento enzimático en condiciones óptimas de tiempo de incubación y concentración de preparado enzimático como parte del proceso de elaboración de jugo de zanahoria en la industria, y compararlo con el proceso de fabricación convencional con respecto al rendimiento de extracción de jugo y a las características físico-químicas de este.

III. MARCO TEÓRICO

3.1 GENERALIDADES DE LA ZANAHORIA

La zanahoria es un cultivo de raíz perteneciente a la familia Umbelliferae, al género *Daucus* y a la especie *Carota* (Sharma *et al.*, 2009). Es originaria del centro de Asia y del Mediterráneo, actualmente se encuentra distribuida a lo largo del mundo y es catalogada como el segundo vegetal de raíz más importante, después de la papa (Cámara Agropecuaria y Agroindustrial de El Salvador, 2005; Sharma *et al.*, 2005).

La zanahoria es rica en compuestos bioactivos, como los carotenoides, y fibra dietética; contiene además niveles apreciables de otros componentes funcionales, los cuales poseen propiedades promotoras de la salud. Su consumo, tanto en fresco como procesada, aumenta sostenidamente gracias a su reconocimiento como una fuente de antioxidantes naturales que poseen actividad anticancerígena (Sharma *et al.*, 2010).

3.1.1 Situación en Costa Rica y el mundo

El cultivo de zanahoria en el mundo ha experimentado un crecimiento importante en los últimos años (Cámara Agropecuaria y Agroindustrial de El Salvador, 2005). Según estadísticas de la FAO, para el año 2009 la producción mundial de zanahorias y nabos fue liderada por China, con 15.168.351 toneladas métricas; seguida por la Federación Rusa y Estados Unidos (FAOSTAT, 2011).

En Costa Rica, los híbridos cosechados son Bolero F1 y Bangor F1, siendo este último el de mayor cultivo (Richmond-Zumbado & Méndez-Soto, 2010). No se encontró datos reportados de la producción de este cultivo en el país, sin embargo, se estima que en el cantón de Zarcero, para el año 2010 la producción de zanahoria fue de aproximadamente 860.000 kg (Alfaro, 2011).

3.1.2 Principales componentes nutricionales

La zanahoria se caracteriza por ser un vegetal rico en compuestos naturales bioactivos, específicamente en carotenoides. Es una buena fuente de pro-vitamina A y de algunos minerales; además se caracteriza por su alto contenido de humedad y baja proporción de lípidos y proteínas (van den Berg *et al.*, 2000; Cámara Agropecuaria y Agroindustrial de El Salvador, 2005; Sharma *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2006; USDA, 2010).

Con base en la revisión de varios estudios, Sharma *et al.* (2010) reportaron que la zanahoria puede contener entre 86-89 % de humedad, 6,0-10,6 % de carbohidratos, 0,7-1,1 % de proteína, 0,2-0,5 % de lípidos, 1,2-2,4 % de fibra cruda, 1,1 % de cenizas, 5,6 % de azúcares totales y 5,33 mg/100 g de carotenos. Como principales minerales se encuentran el calcio, fósforo, hierro, magnesio, sodio, potasio, cobre y zinc; y entre las vitaminas, destacan la tiamina, riboflavina, niacina, tocoferol y ácido ascórbico.

3.1.2.1 Carotenoides

Los carotenoides son una de las clases de pigmentos más grandes en la naturaleza (van den Berg *et al.*, 2000) y su nombre genérico se deriva de la zanahoria, *Daucus carota*, ya que fue de esta hortaliza de donde por primera vez fueron aislados (Badui, 1999).

Estos compuestos son sintetizados por plantas y microorganismos (El-Agamey *et al.*, 2004) y se encuentran ampliamente distribuidos en tejidos vegetales comestibles (von Elbe & Schwartz, 1996). Una característica importante, es su extendido sistema de dobles enlaces conjugados, que constituye el grupo cromóforo que les confiere su atractivo color (rojo, amarillo y anaranjado) y provee el espectro de absorción visible que sirve como base para su identificación y cuantificación (Rodríguez-Amaya & Kimura, 2004).

En flores y frutas, los carotenoides se localizan en los cromoplastos, y son sintetizados y secuestrados en los plastidios (van den Berg *et al.*, 2000). Estos pueden encontrarse en forma libre disueltos en la fracción lipídica del tejido vegetal, formando complejos con proteínas, unidos a hidratos de carbono por medio de enlaces glucosídicos o como ésteres de ácidos grasos (palmítico y linoléico) (Badui, 1999).

Los carotenoides desempeñan funciones importantes en el proceso de fotosíntesis y de foto protección en los tejidos de las plantas (von Elbe & Schwartz, 1996). Además tienen diversas funciones biológicas, dentro de las cuales, la que está mejor documentada y establecida es la actividad de pro-vitamina A que presentan algunos de ellos, especialmente el β-caroteno (van den Berg *et al.*, 2000). Algunas funciones biológicas de este grupo de compuestos se presentan en el Cuadro I.

Cuadro I. Funciones biológicas de los carotenoides.

Función	Carotenoides
Pro-vitamina A	β-caroteno, α-caroteno y β-criptoxantina
Antioxidante	Todos los carotenoides
Comunicación celular	β-caroteno, cantaxantina y criptoxantina
Potenciador de la función inmune	β-caroteno
Protección de la piel contra los rayos UV	β-caroteno y licopeno
Protección de la mácula	Luteína y zeaxantina

Fuente: van den Berg *et al.*, 2000.

A partir de estudios epidemiológicos, existe evidencia que una dieta rica en frutas y vegetales, está asociada con una baja incidencia de ciertos tipos de cáncer y otras enfermedades; se cree que el estrés oxidativo y el ataque de radicales libres, son unos de los factores que están mayormente asociados con su iniciación y propagación (El-Agamey *et al.*, 2004).

En el caso de enfermedades cardiovasculares, se ha encontrado un efecto protector del β-caroteno mediante estudios epidemiológicos y observacionales (van den Berg *et al.*, 2000). Asimismo, los carotenoides han sido implicados en la prevención y la protección contra el cáncer (Britton, 1995). Del mismo modo, estudios epidemiológicos han mostrado una asociación inversa entre la ingesta de antioxidantes y carotenoides o el nivel de estos en la sangre, y el riesgo de contraer cataratas, degeneración macular relacionada con la edad y otros trastornos ópticos (van den Berg *et al.*, 2000).

Se cree que estos factores dietarios inhiben el arranque de las enfermedades por su virtud como antioxidantes, específicamente la habilidad para extinguir las moléculas de oxígeno singulete e interactuar con los radicales libres. Sin embargo, otros mecanismos han sido reportados (modulación del metabolismo carcinogénico, inhibición de la proliferación celular, entre otros) (Rodríguez-Amaya & Kimura, 2004).

Estructura

Las funciones y acciones naturales de los carotenoides están determinadas por las propiedades físicas y químicas de las moléculas, las cuales están definidas por su estructura molecular (Britton, 1995). Más de 600 carotenoides han sido identificados en la naturaleza, sin embargo, solo aproximadamente 40 están presentes en una dieta humana común (Rao & Rao, 2007).

La estructura básica de la mayoría de estos compuestos es poliénica de 40 átomos de carbono, formada por ocho unidades de isopreno unidas covalentemente, cuyo arreglo se hace inverso en el centro (von Elbe & Schwartz, 1996; Badui, 1999). El esqueleto básico puede ser modificado de diversas maneras, incluyendo ciclización, hidrogenación, deshidrogenación, introducción de funciones oxigenadas, rearreglos, acortamiento de cadena, o combinaciones, lo cual resulta en una gran cantidad de estructuras (Rodríguez-Amaya & Kimura, 2004).

La característica más llamativa de los carotenoides como grupo, y que les confiere su distintiva forma molecular, reactividad química y propiedades de absorción de luz, es su largo sistema de dobles y simples enlaces alternados que forman la parte central de la molécula, lo cual constituye un sistema conjugado donde los electrones pi están efectivamente deslocalizados a lo largo de la cadena (Britton, 1995).

De acuerdo con su estructura, los carotenoides se dividen en dos grupos principales: carotenos y xantófilas. Los primeros son hidrocarburos poliénicos puros (como β-caroteno, α-caroteno y licopeno); las xantófilas por su parte, son carotenos que contienen funciones oxigenadas, como grupos hidroxi, epoxi, aldehído y ceto (como luteína y violaxantina) (Belitz & Grosch, 1992; von Elbe & Schwartz, 1996; Badui, 1999).

En términos generales, en la naturaleza la cantidad de xantófilas sobrepasa la de carotenos. Sin embargo, la zanahoria presenta mayor cantidad de carotenos, principalmente de β-caroteno; el α-caroteno y las xantófilas representan una fracción minoritaria (Badui, 1999). A continuación en la Figura 1 se presenta la estructura del β-caroteno.

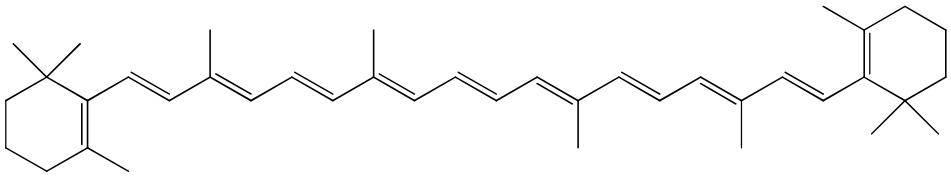

Figura 1. Estructura del β-caroteno.

Propiedades físicas y químicas

Los carotenoides son compuestos lipofílicos, moderadamente estables al calor y sujetos a la pérdida de color por oxidación. Son fácilmente isomerizados por calor, ácido o luz y profundamente coloreados (von Elbe & Schwartz, 1996; van den Berg *et al*., 2000).

- Oxidación

Los carotenoides contienen un sistema reactivo rico en electrones susceptible a reacciones con compuestos electrofílicos, las cuales son responsables de la inestabilidad de estos hacia la oxidación (van den Berg *et al.*, 2000). Para aquellos que tienen actividad pro-vitamina A, la oxidación resulta en la pérdida de la actividad como pro-vitamina (von Elbe & Schwartz, 1996).

Diferentes autores han propuesto que cuando el β-caroteno reacciona con radicales peroxilo (generados durante el proceso de autooxidación de los lípidos (El-Agamey *et al.*, 2004)), ocurre una reacción de adición directa para formar un radical carbono centrado estabilizado por resonancia, que puede después reaccionar con otros radicales peroxilo para formar una especie no radicalaria; esto sucede a concentraciones de oxígeno relativamente bajas, donde los carotenoides actúan como compuestos antioxidantes (Britton, 1995).

Distintos patrones alternativos son posibles, sin embargo, cuando la concentración de oxígeno es mayor, un radical carotenoide puede reaccionar con el oxígeno para generar un radical peroxilo carotenoide mediante un proceso de autooxidación, en el cual, el radical peroxilo carotenoide puede actuar como prooxidante, promoviendo la oxidación de lípidos insaturados e intensificar el daño oxidativo (Britton, 1995).

La oxidación de los carotenoides se acelera con el calor, y la reacción es catalizada por la presencia de metales (como hierro y cobre), la luz y el oxígeno (Badui, 1999). La actividad del agua también influye en la velocidad de estas reacciones (Belitz & Grosch, 1992).

Además, la actividad enzimática, particularmente de la lipooxigenasa (LPO), acelera la degradación oxidativa por medio de un mecanismo indirecto donde la LPO primero cataliza la oxidación de ácidos grasos insaturados y poliinsaturados para producir peróxidos, y estos luego reaccionan con los carotenoides (von Elbe & Schwartz, 1996).

Rodríguez-Amaya & Kimura (2004) mencionan, que en contraste con la amplia información disponible con respecto a la oxidación lipídica, el conocimiento de la oxidación de los carotenoides permanece fragmentada.

Debido a que los carotenoides se oxidan con facilidad, no es sorprendente que posean propiedades antioxidantes (von Elbe & Schwartz, 1996). La habilidad que poseen para

extinguir especies reactivas los hace muy eficientes para proteger a las células del daño oxidativo, por lo que su función es importante prácticamente en todos los organismos, ya que las moléculas electrónicamente excitadas son capaces de reaccionar con compuestos biológicamente importantes y perjudicar su función (van den Berg *et al.*, 2000).

- Isomerización

Según el arreglo de los sustituyentes, los dobles enlaces carbono carbono de los carotenoides pueden existir en configuración *cis* o *trans* (van den Berg *et al.*, 2000). En las fuentes naturales, los carotenoides se encuentran mayormente en la configuración todo-*trans* (van den Berg *et al.*, 2000) y en esta forma son biológicamente activos como precursores de vitamina A (Badui, 1999).

Diversos estudios indican que en el caso del β-caroteno, el isómero todo-*trans* es absorbido preferentemente con respecto a los isómeros *cis* en humanos; se ha demostrado además en roedores, que el todo-*trans*-β-caroteno es más biodisponible que los isómeros 9-*cis*- y 13-*cis*-. Por otra parte, con respecto a la capacidad como antioxidantes, los isómeros *cis* han demostrado ser menos efectivos que el todo-*trans*-β-caroteno (Schieber & Carle, 2005).

Efecto del procesamiento

Los carotenoides están sujetos a muchos cambios químicos inducidos por las condiciones de procesamiento, los cuales pueden provocar cambios en el color y reducir el valor nutricional de los alimentos (Badui, 1999). La alteración o pérdida de estos, durante el procesamiento y el almacenamiento, puede ocurrir a través de la remoción física, la oxidación enzimática y no enzimática y la isomerización geométrica (Rodríguez-Amaya & Kimura, 2004).

La oxidación, enzimática y no enzimática, se considera la principal causa de la degradación de los carotenoides. La magnitud de estas reacciones depende de los carotenoides presentes, el oxígeno disponible, la exposición a la luz, la presencia de enzimas, de metales y de compuestos prooxidantes y antioxidantes (Rodríguez-Amaya & Kimura, 2004).

Indistintamente del método de procesamiento, la retención de los carotenoides disminuye con largos tiempos y altas temperaturas de proceso, el pelado y el despulpado de los alimentos. El contenido de carotenoides en los alimentos puede ser mejorado al reducir el tiempo y la temperatura de proceso, y disminuir el tiempo que existe entre el pelado, el corte o el despulpado y el procesamiento del alimento (Rodríguez-Amaya & Kimura, 2004). Los

carotenoides son además, compuestos muy sensibles al oxígeno y a la luz (Belitz & Grosch, 1992).

Las reacciones de isomerización son fácilmente inducidas por tratamientos térmicos, exposición a solventes orgánicos, tratamiento con ácidos y exposición a la luz (von Elbe & Schwartz, 1996; Rodríguez-Amaya & Kimura, 2004). En general, se considera que de un 15 a 35 % de los carotenoides se isomerizan durante la industrialización de los productos vegetales (Badui, 1999).

Con respecto a la congelación, algunos autores mencionan que esta puede causar pequeños cambios en el contenido de carotenoides en los alimentos (von Elbe & Schwartz, 1996); mientras que otros sostienen que este proceso, especialmente la congelación rápida, preserva los carotenoides, sin embargo, que la descongelación lenta puede ser perjudicial, especialmente cuando el alimento no ha sido correctamente escaldado (Rodríguez-Amaya & Kimura, 2004). Por otra parte, al ser compuestos insolubles en agua, los carotenoides no tienden a perderse por lixiviación (Badui, 1999).

Recientemente, la atención se ha centrado en el efecto del procesamiento sobre la biodisponibilidad de los carotenoides. Estos compuestos se encuentran naturalmente protegidos por estructuras celulares, cuya destrucción propicia la degradación, pero al mismo tiempo favorece la biodisponibilidad. Con base en esto, se sugiere que las condiciones de un proceso deben ser optimizadas para minimizar la pérdida de carotenoides potenciando al mismo tiempo su biodisponibilidad (Rodríguez-Amaya & Kimura, 2004).

3.1.3 Procesamiento

Además de ser la zanahoria utilizada tradicionalmente en la preparación de ensaladas, jugos y otros a nivel de hogar (Sharma *et al.*, 2005; Sharma *et al.*, 2010), esta puede ser convertida en productos procesados de alta calidad nutricional, como jugos, concentrados, bebidas, enlatados, conservas, encurtidos, alimentos deshidratados, confites (Sharma *et al.*, 2010), alimentos para bebés y congelados, entre otros (Sharma *et al.*, 2005).

3.1.3.1 Jugos de vegetales

Según Bates *et al.* (2001), un jugo de vegetal se define como el líquido no fermentado pero fermentable, o el producto por fermentación láctica, destinado para el consumo directo, obtenido de la parte comestible de uno o más vegetales y preservado exclusivamente por

métodos físicos. El cual deberá estar libre de cáscaras, semillas y otras partes gruesas de los vegetales; y puede ser clarificado, turbio o pulposo.

En la actualidad, estos jugos de vegetales están atrayendo mayor atención debido al valor nutricional que presentan algunos vegetales. El jugo de tomate y sus mezclas, han sido muy populares y representan más del 90 % del comercio de jugos de vegetales; sin embargo, otros jugos, como el de zanahoria, son cada vez más aceptados por el consumidor (Bates *et al.*, 2001).

Además de las aplicaciones tradicionales, la mayor distinción entre los jugos de frutas y de vegetales, radica en su composición. La mayoría de los vegetales no son particularmente altos en azúcar y son bajos en ácidos, resultando en jugos con valores de pH generalmente superiores a 4,5. Como consecuencia, los jugos de vegetales son más susceptibles al deterioro microbiano y requieren una reducción en el pH, lo cual cambia las características del jugo, o un proceso más riguroso para eliminar los microorganismos potencialmente peligrosos (Bates *et al.*, 2001).

Confundiendo la separación entre los jugos de frutas y de vegetales, se encuentra una variedad de mezclas de jugos de frutas y de zanahoria, las cuales son un éxito en el mercado. A pesar de que el ingrediente mayoritario es la zanahoria, el carácter de las frutas es predominante; generalmente el jugo de zanahoria contribuye con la imagen saludable y con el color, mientas que el jugo de frutas aporta el sabor y la reducción necesaria en el pH de la mezcla (Bates *et al.*, 2001).

El jugo es uno de los productos a base de zanahoria mayormente aceptados (Sharma *et al.*, 2005). Este y sus mezclas, se encuentran entre las bebidas no alcohólicas más populares, y se ha reportado un incremento sostenido en el consumo de jugo de zanahoria en varios países (Sharma *et al.*, 2010). La tendencia en general para el mercadeo de los jugos enfatiza en la funcionalidad, atributos de salud, nuevas mezclas de sabores y en algunos casos, fortificación con vitaminas y minerales (McLellan & Padilla-Zakour, 2005).

3.2 PROCESO DE PRODUCCIÓN DE JUGO DE FRUTAS Y DE VEGETALES

El proceso de producción de un jugo, parte de materia prima sana, recién cosechada o almacenada en refrigeración o congelación. Como primera etapa del proceso, se realiza un

lavado exhaustivo para remover tierra y objetos extraños, seguido por etapas de desinfección, selección y clasificación (McLellan & Padilla-Zakour, 2005).

En algunos casos, puede ser necesario incluir una operación de escaldado (Lozano, 2006), el cual se aplica con el objetivo principal de destruir la actividad enzimática que presentan las frutas y vegetales, evitando así la ocurrencia de cambios no deseados en su valor nutricional y características sensoriales (Fellows, 1994).

Para la mayoría de frutas, etapas de preparación como picado y molienda, pueden ser requeridas previamente a la extracción del jugo. El calentamiento y la adición de enzimas pueden ser también incluidos antes de que la pulpa sea transferida a la etapa de extracción, la cual puede ser llevada a cabo por prensado o decantación posterior a un tratamiento enzimático (McLellan & Padilla-Zakour, 2005).

El jugo extraído, es seguidamente tratado de acuerdo con las características deseadas en el producto final. En el caso de los jugos turbios, como el de zanahoria, una etapa de clarificación no es requerida, sin embargo, se puede involucrar una filtración gruesa o una centrifugación controlada para remover partículas grandes insolubles. El siguiente paso, usualmente es un tratamiento térmico (o equivalente no térmico) para alcanzar la inocuidad y la estabilidad del producto; finalmente el jugo es empacado y almacenado (McLellan & Padilla-Zakour, 2005).

3.2.1 Tratamientos enzimáticos

Las enzimas son proteínas que poseen actividad catalítica, debido a su capacidad específica de conversión de sustratos en productos (Whitaker, 1996). Las enzimas pectinolíticas específicamente, son de gran importancia y tienen un alto potencial en el sector comercial, especialmente en la industria de jugos y otros alimentos y en la industria papelera (Jayani *et al.*, 2005). Su aplicación comercial fue observada por primera vez en 1930 en la producción de vinos y jugos (Kashyap *et al.*, 2001), y estas representan el 25 % de las ventas globales de enzimas para aplicación en alimentos (Jayani *et al.*, 2005).

Las enzimas pectinolíticas son utilizadas en la producción de jugos como coadyuvantes para la elaboración, con el fin de mejorar la calidad del producto e incrementar la eficiencia de operaciones como el pelado, extracción de jugo, clarificación y extracción de productos con valor agregado. Asimismo las celulasas y las amilasas, también facilitan la maceración,

licuefacción y clarificación de jugos de frutas, reduciendo los costos de procesamiento y mejorando el rendimiento (Bayindirli, 2010). Se han observado efectos sinérgicos al utilizar enzimas pectinolíticas y celulolíticas en combinación (McLellan & Padilla-Zakour, 2005).

Las enzimas pectinolíticas, también llamadas pectinasas, son un grupo heterogéneo de enzimas relacionadas que hidrolizan sustancias pécticas (Jayani *et al.*, 2005), las cuales son polisacáridos estructurales presentes en la lamela media y la pared celular primaria de células vegetales (Kashyap *et al.*, 2001). La mayoría de estas pectinasas son producidas a partir de fuentes fúngicas, más comúnmente de *Aspergillus niger* (Jayani *et al.*, 2005), a través de procesos fermentativos en condiciones estrictamente controladas (Bayindirli, 2010).

Las pectinasas se pueden clasificar según se describe a continuación con base en lo descrito por Jayani *et al.* (2005). Se presentan además las reacciones generales según lo establecido por McLellan & Padilla-Zakour (2005).

i) Protopectinasas

Son enzimas que catalizan la solubilización de la protopectina. Estas se clasifican en dos tipos según su mecanismo de reacción, las de tipo A reaccionan con la parte interna de la molécula, mientras que las de tipo B con la parte externa de la protopectina (Jayani *et al.*, 2005).

ii) Poligalacturonasas

Son enzimas que catalizan el rompimiento hidrolítico de las cadenas de ácido galacturónico con la introducción de agua entre el puente de oxígeno, y representan el grupo de enzimas pectinolíticas más extensamente estudiado. Las enzimas poligalacturonasas involucradas en la hidrólisis de las sustancias pécticas son endo- y exo-poligalacturonasas (Jayani *et al.*, 2005).

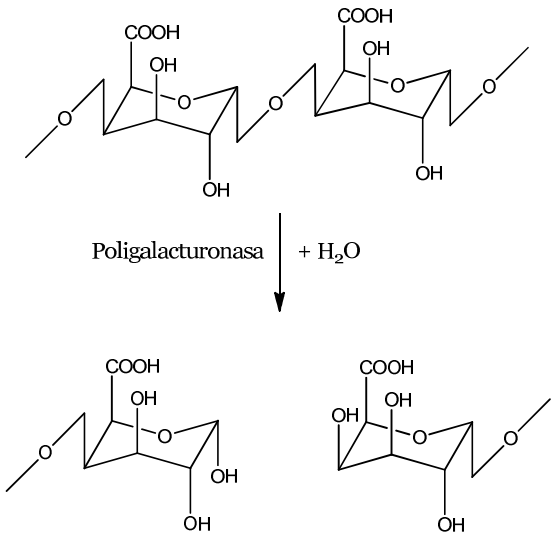

Figura 2. Modo general de acción de las enzimas poligalacturonasas.

iii) Liasas o transeliminasas

Son enzimas que catalizan el rompimiento no hidrolítico de los pectatos y pectinas, caracterizado por una división *trans* eliminativa del polímero péctico. Estas rompen el enlace glicosídico en el C-4 y eliminan simultáneamente hidrógeno del C-5, generando un producto insaturado. Pueden ser clasificadas en varios tipos según el mecanismo de acción y el sustrato sobre el cual actúan (Jayani *et al.*, 2005).

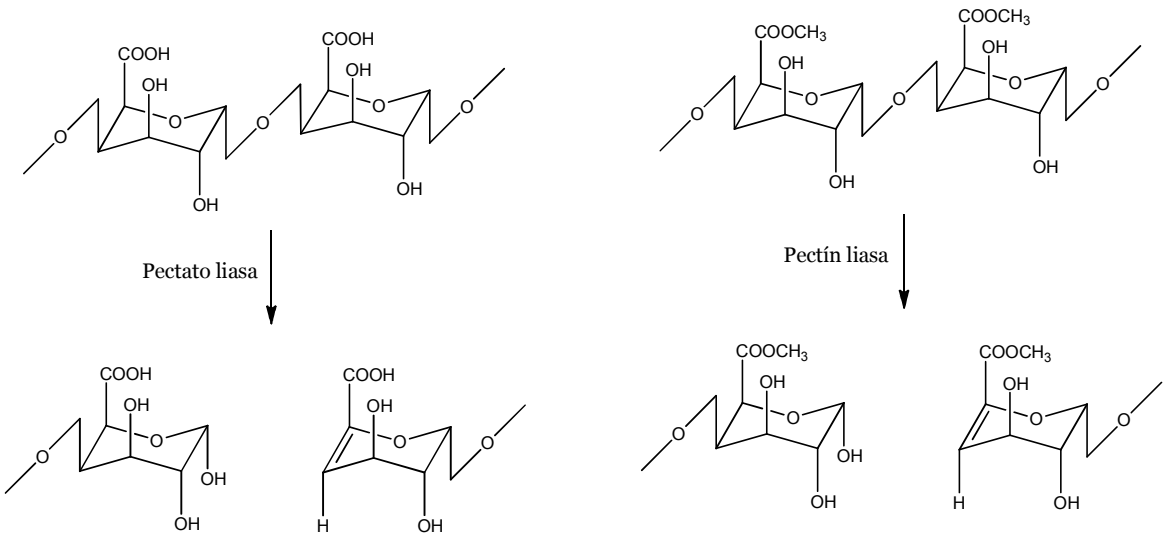

Figura 3. Modo general de acción de las enzimas liasas.

iv) Pectinesterasas

Son enzimas que catalizan la desesterificación de enlaces metil éster del esqueleto de galacturonano de las sustancias pécticas para liberar metanol y pectinas ácidas, sobre las cuales podrán actuar poligalacturonasas y liasas (Jayani *et al.*, 2005).

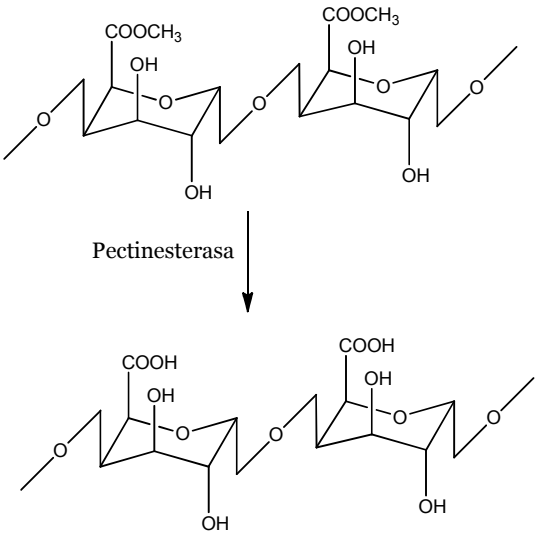

Figura 4. Modo general de acción de las enzimas pectinesterasas.

Los preparados enzimáticos utilizados en el procesamiento de alimentos contienen una o una mezcla de dos o más enzimas activas responsables de un efecto técnico determinado (FDA,

2010). Estos contienen, además de las enzimas de interés, otras sustancias como diluyentes, preservantes y estabilizantes; además, pueden contener otras enzimas, metabolitos del organismo productor y residuos de los materiales utilizados como medio fermentativo (Bayindirli, 2010).

Comercialmente, para el tratamiento de pulpas en la producción de jugos, se utilizan preparados enzimáticos pectinolíticos con actividad poligalacturonasa, pectínliasa, pectatoliasa y pectinesterasa. Las celulasas, que son capaces de hidrolizar los polisacáridos no pécticos, como celulosa, glucanos y xilanos, son utilizadas para fraccionar las paredes celulares y licuar los sólidos remanentes (McLellan & Padilla-Zakour, 2005).

Los preparados enzimáticos son utilizados para el procesamiento de alimentos en niveles muy pequeños, y comúnmente son removidos del alimento final o inactivados (FDA, 2010). Normalmente, una pulpa es calentada a una temperatura apropiada previamente a la adición de un preparado de enzimas pectinolíticas en la dosis recomendada por el proveedor; y la reacción puede tomar de 1 a 2 horas (McLellan & Padilla-Zakour, 2005; Lozano, 2006).

La velocidad de las reacciones durante el tratamiento enzimático está influenciada por varios factores, entre los que se encuentran el tipo de preparado enzimático, la concentración de enzimas, el tiempo de incubación, la temperatura de hidrólisis (Sun *et al.*, 2006), la concentración de sustrato, el pH y la presencia de inhibidores y activadores (Bayindirli, 2010).

La aplicación de tratamientos enzimáticos para la obtención de jugo de zanahoria ha sido abordada por varios autores. Dinnella *et al.* (2000) determinaron que el rendimiento de extracción de jugo, el color, la densidad, el contenido de carotenoides, las propiedades sensoriales y la calidad nutricional aumentan con la concentración de enzimas. Liao *et al.* (2007) determinaron que al aplicar un tratamiento enzimático se produce un aumento en el rendimiento, los sólidos solubles totales, los carotenoides y los parámetros de color, así como una disminución en la viscosidad. Qin *et al.* (2005) estudiaron el efecto de la hidrólisis enzimática y la adición de hidrocoloides en la calidad de jugo de zanahoria, determinando que el uso de enzimas aumenta el rendimiento de extracción de jugo y mejora la calidad general de este.

La optimización de los tratamientos enzimáticos en pulpa de zanahoria ha sido estudiada utilizando la metodología de superficie de respuesta por diversos autores. Vandana & Das Gupta (2006) optimizaron la concentración de enzimas, el tiempo de reacción y la temperatura para la extracción de jugo de zanahoria, en función del rendimiento y la turbidez del jugo. Sun *et al.* (2006) estudiaron el efecto de la concentración de enzimas, el tiempo de reacción y su interacción sobre el contenido de β-caroteno, el rendimiento y la viscosidad del jugo de zanahoria; estos autores determinaron que la viscosidad disminuye significativamente y el rendimiento y los °Brix aumentan con la maceración enzimática, mientras que el contenido de β-caroteno y la turbidez varían de acuerdo con el tipo de preparado enzimático utilizado.

Asimismo, en jugo de zanahoria, Sharma *et al.* (2005) mencionan que bajo condiciones óptimas de operación (concentración de enzimas, proporción de enzimas pectinolíticas y celulolíticas, tiempo y temperatura) se logró aumentar el rendimiento de extracción en un 13,95 %. Por otra parte, Chadha *et al.* (2003) determinaron en su estudio, que el tratamiento enzimático logró disminuir la viscosidad y aumentar el pH, los índices de color, el contenido de sólidos totales y el rendimiento del jugo entre un 5 y un 10 %.

3.3 PARÁMETROS DE CALIDAD EN JUGOS DE FRUTAS Y DE VEGETALES

Shachman (2005), en el contexto de bebidas no alcohólicas, define una bebida de calidad como aquella que cumple con los estándares de desempeño esperados por el manufacturador y el consumidor. Existen distintas especificaciones de calidad que aplican para jugos de frutas y de vegetales. Entre ellas, se encuentra el perfil sensorial, incluyendo el sabor y la apariencia, como uno de los parámetros más críticos; así como también la inocuidad del alimento (Shachman, 2005).

Entre otras especificaciones de calidad importantes, destacan el contenido de sólidos solubles (°Brix), el pH y la acidez titulable, que definen el balance ácido del producto; el color y el valor nutritivo (Bates *et al.*, 2001; López, 2003).

En jugo de zanahoria específicamente, se consideran como parámetros de calidad importantes adicionalmente el contenido de β-caroteno, la viscosidad (Sun *et al.*, 2006), el

contenido de azúcares reductores, de pectina, de vitamina C (Sharma *et al.*, 2009) y la estabilidad relativa a la turbidez (Sun *et al.*, 2006).

3.4 OPTIMIZACIÓN DE PROCESOS

3.4.1 Metodología de superficie de respuesta

La experimentación se aplica para determinar el efecto de variables independientes sobre variables dependientes en un proceso, y la relación entre ellas usualmente ilustrada a través de un modelo de regresión generado a partir de los datos experimentales. El diseño de experimentos, DOE por sus siglas en inglés, es una técnica de experimentación eficiente, que ha sido aplicada en diversos campos, como en la industria automovilística, alimentaria y textil, entre muchas otras, para fabricar productos de alta calidad, operar más económicamente y asegurar procesos más estables y confiables (Raissi, 2009).

Existen diversos métodos de diseño de experimentos; la selección del más adecuado se realiza de acuerdo con los objetivos del experimento y con el número de factores que se pretenden evaluar. Los objetivos del experimento pueden ser clasificados como tamizaje, comparación y aplicación de la metodología de superficie de respuesta (Raissi, 2009).

La metodología de superficie de respuesta, RSM por sus siglas en inglés, es una de las técnicas que se utilizan para encontrar las condiciones bajo las cuales un proceso determinado alcanza el resultado óptimo. Es decir, permite determinar los niveles de los factores del diseño, en los cuales la respuesta alcanza su valor óptimo, el cual puede ser máximo o un mínimo de la función de los parámetros del diseño (Raissi & Farsani, 2009). Esta está basada en tres tipos de matrices de diseño de experimentos, entre ellos, diseños centrales compuestos (Raissi, 2009).

La metodología de superficie de respuesta, es un conjunto de métodos estadísticos y matemáticos de gran utilidad para modelar y analizar problemas ingenieriles. En esta técnica, el objetivo principal es optimizar la superficie de respuesta; pero también es posible cuantificar la relación entre los factores y la respuesta. A través de esta, es posible optimizar simultáneamente múltiples respuestas de interés (Raissi & Farsani, 2009).

En el proceso de diseño de la metodología de superficie de respuesta se cumplen los siguientes pasos: i) se diseña una serie de experimentos para la medición adecuada y

confiable de la respuesta de interés, ii) se desarrolla un modelo matemático de la superficie de respuesta de segundo orden con el mejor ajuste, iii) se encuentra la combinación óptima de factores que produce un valor máximo o mínimo en la respuesta y iv) se representan los efectos directos e interactivos de los factores a través de gráficos bi y tridimensionales (Raissi & Farsani, 2009).

La metodología de superficie de respuesta reduce el número de pruebas experimentales requeridas para evaluar múltiples parámetros y sus interacciones; por lo que su aplicación es menos laboriosa y consumidora de tiempo en comparación con otros enfoques (Sin *et al.*, 2006). Esta ha sido ampliamente aplicada para la optimización de procesos en la industria alimentaria (Sin *et al.*, 2006), e incluso extensivamente para la optimización de procesos de producción de jugos (Abdullah *et al.*, 2007).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 LOCALIZACIÓN DEL PROYECTO

La selección del preparado enzimático más adecuado para maximizar el rendimiento de extracción de jugo de zanahoria, la optimización de las condiciones del tratamiento enzimático y la realización de pruebas en las condiciones óptimas de proceso a nivel de planta piloto, se llevaron a cabo en el laboratorio de química de la Escuela de Tecnología de Alimentos y en la planta piloto del Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA), en la Universidad de Costa Rica, Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, ubicada en San Pedro, Montes de Oca.

La caracterización del proceso convencional de elaboración de jugo de zanahoria en la industria y la implementación del proceso en las condiciones óptimas a nivel industrial, se llevó a cabo en la industria procesadora de frutas y vegetales, ubicada en Zarcero.

Las determinaciones físicas y químicas se realizaron en los laboratorios de química de la Escuela de Tecnología de Alimentos y del CITA, así como también en la planta piloto del CITA; la evaluación sensorial, en el laboratorio de análisis sensorial de la Escuela de Tecnología de Alimentos.

4.2 MATERIA PRIMA

Se utilizó zanahoria (*Daucus carota* L.) de la variedad Bangor, la cual fue cosechada en distintas zonas de Zarcero y provista por la empresa en estado fresco. Esta fue enfriada en agua con hielo al ser recibida, empacada en bolsas de polietileno con agujeros y almacenada en refrigeración (7 °C) por un máximo de siete días hasta ser utilizada.

La zanahoria cumplió con los parámetros de calidad establecidos por la industria para la materia prima empleada en la fabricación de jugo (°Brix, color, ausencia de grietas o daño mecánico, ausencia de daño por nemátodos, relación exocarpio:endocarpio y tamaño).

4.3 PREPARADOS ENZIMÁTICOS

Para la selección del preparado enzimático más adecuado para incrementar el rendimiento de extracción de jugo de zanahoria, se evaluaron tres preparados enzimáticos comerciales disponibles en el mercado nacional, destinados a la producción industrial de jugos de frutas y vegetales. Estos fueron seleccionados según su funcionalidad y categorización como provenientes de organismos no genéticamente modificados.

Se utilizaron los preparados enzimáticos P1, P2 y P3, los cuales fueron almacenados en refrigeración (4 °C). En el Cuadro II se presenta una síntesis de la información disponible sobre las características principales de los distintos preparados enzimáticos.

Cuadro II. Características principales de los preparados enzimáticos utilizados con el fin de incrementar el rendimiento de extracción de jugo de zanahoria.

Preparado enzimático	Fuente	Actividad principal	Enzima declarada / actividad declarada	Temperatura/ pH óptimos
P1	*Aspergillus aculeatus*, *Trichoderma reesei* y *Aspergillus niger*	Celulasa, pectinliasa y poligalacturonasa	Pectinliasa / 3000 PECTU/mL	55-60 °C / < 5,0
P2	*Aspergillus aculeatus*	Poligalacturonasa	Poligalacturonasa / 9500 PGU/mL	15-55 °C /2,8-4,5
P3	*Aspergillus aculeatus* y *Aspergillus niger*	Pectinliasa y poligalacturonasa	Pectinliasa / 10000 PECTU/mL	No reportado

Para la optimización del tratamiento enzimático y para las pruebas a nivel piloto e industrial, se utilizó el preparado enzimático seleccionado con base en los resultados de las pruebas experimentales (sección 4.4.2).

4.4 PRUEBAS EXPERIMENTALES

4.4.1 Caracterización del proceso convencional de fabricación de jugo de zanahoria a nivel industrial

Se realizaron tres visitas a la industria con el fin de caracterizar la materia prima, el proceso y el producto terminado para tres lotes de producción de jugo de zanahoria de

aproximadamente 900 kg cada uno, en las condiciones normales de fabricación, las cuales se describen de manera general en la Figura 5.

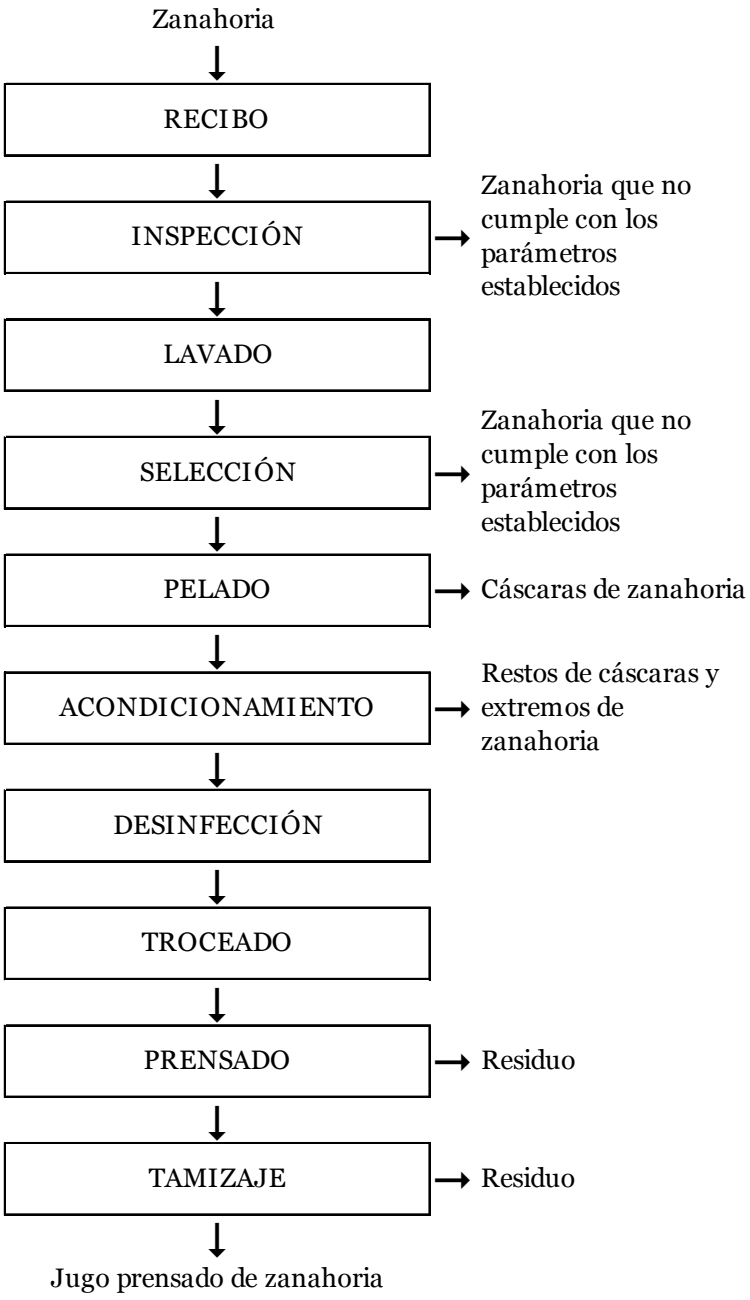

Figura 5. Flujo de proceso general para la elaboración de jugo de zanahoria a nivel industrial mediante el proceso convencional.

4.4.1.1 Caracterización de la materia prima

Se determinó el pH, la acidez, el color, el contenido de sólidos solubles, de carotenoides totales, de polifenoles totales y de azúcares (sacarosa, glucosa y fructosa) para cada lote homogéneo de materia prima. Se realizó además un análisis proximal completo y se determinó la capacidad antioxidante (ORAC).

4.4.1.2 Caracterización del proceso

Se determinó el rendimiento del proceso de extracción de jugo de zanahoria para cada lote, mediante la relación entre la masa de la zanahoria pelada y el jugo de zanahoria obtenido luego de la molienda de las zanahorias, el prensado de la pulpa y el tamizaje del jugo.

4.4.1.3 Caracterización de producto terminado

Se determinó el pH, la acidez, el color, la turbidez, el contenido de sólidos solubles, de sólidos insolubles en suspensión, de carotenoides totales, de polifenoles totales y de azúcares (sacarosa, glucosa y fructosa) para cada lote homogéneo de producto terminado. Se realizó además un análisis proximal completo y se determinó la capacidad antioxidante (ORAC).

4.4.1.4 Análisis estadístico

Se calculó el promedio y el intervalo de confianza ($\alpha = 0,05$) de los datos obtenidos para cada uno de los parámetros evaluados. Se realizó una prueba t de Student para comparar los promedios de las características físico-químicas de la materia prima y del producto terminado para las variables respuestas que corresponde, determinando con una $p < 0,05$ la existencia de diferencias significativas. Se utilizó el programa Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft Corporation©, USA) y JMP® versión 4.0.4 (SAS Institute Inc, USA).

4.4.2 Selección del preparado enzimático más adecuado para maximizar el rendimiento de extracción de jugo de zanahoria a nivel de laboratorio

4.4.2.1 Diseño experimental

Mediante la aplicación de un diseño irrestricto aleatorio se evaluaron 5 tratamientos, con el fin de observar y comparar el rendimiento de extracción de jugo de zanahoria y las características físico-químicas de este al aplicar distintos o ningún tratamiento enzimático; así

como también de determinar la influencia de la temperatura a la cual se realiza el tratamiento enzimático, sobre dichas variables respuesta.

Los tratamientos del diseño correspondieron a la extracción de jugo de zanahoria por el método convencional (sin la aplicación de un tratamiento enzimático) (número 1), a la extracción de jugo de zanahoria mediante la aplicación de un tratamiento enzimático agregando distintos preparados (números 3, 4 y 5) y a la extracción de jugo de zanahoria mediante la aplicación de las condiciones del tratamiento enzimático (temperatura y tiempo de incubación) sin agregar ningún preparado (muestra control, número 2). Los distintos tratamientos se muestran a continuación en el Cuadro III.

Cuadro III. Tratamientos evaluados para la selección del preparado enzimático más adecuado para maximizar el rendimiento de extracción de jugo de zanahoria nivel de laboratorio.

Número de tratamiento	**Descripción del tratamiento**	
	Condiciones de tratamiento enzimático (tiempo / temperatura)	**Preparado enzimático / concentración**
1	No se aplicó	No se aplicó
2	1 h / T1 °C	No se aplicó
3	1 h / T1 °C	P1 / 200 ppm
4	1 h / T1 °C	P2 / 200 ppm
5	1 h / T1 °C	P3 / 200 ppm

Para los tratamientos donde aplica, se mantuvieron constantes las condiciones de tratamiento enzimático: tiempo de incubación: 1 h, temperatura de incubación: T1 °C y concentración de preparado enzimático: 200 ppm. La principal variable respuesta fue el rendimiento de extracción de jugo; sin embargo, también se determinó el pH, el contenido de sólidos solubles, de sólidos insolubles en suspensión, de sólidos totales, de carotenoides totales, el color y la turbidez del jugo.

La temperatura de tratamiento elegida (T1 °C) se encuentra contenida o próxima a los rangos de temperatura óptima establecidos para los preparados enzimáticos utilizados (ver Cuadro II).

Por otra parte, con respecto a la concentración de enzimas y el tiempo de incubación elegidos (200 ppm, 1 h), los parámetros seleccionados son los recomendados por Novozymes (2004) en general para la maceración enzimática de vegetales.

El experimento se realizó a partir de un mismo lote homogéneo de materia prima y para cada tratamiento se realizaron tres repeticiones, número que fue determinado por medio de pruebas preliminares. El orden de realización de los ensayos se determinó aleatoriamente, con el fin de minimizar los efectos de la variabilidad no explicada en las respuestas observadas debida a factores externos.

4.4.2.2 Elaboración del jugo de zanahoria

Descripción del proceso

Lavado: Se lavaron las zanahorias manualmente con agua por aspersión.

Pelado: Se pelaron las zanahorias manualmente con un pelador.

Cortado: Se cortaron los extremos de las zanahorias manualmente con un cuchillo.

Troceado 1: Se trocearon las zanahorias en rodajas de aproximadamente 1 cm de ancho manualmente con un cuchillo.

Troceado 2 y acidificación: Se trocearon 2 kg de zanahoria en un procesador de alimentos (modelo fp 41, Hobart, USA) junto con M1 % (m/m) de ácido ascórbico y M2 % (m/m) de ácido cítrico, a velocidad única durante 3 min. La acidificación, hasta un pH aproximado de pH1, se realizó principalmente con el fin de asegurar las condiciones óptimas de trabajo para las enzimas (ver Cuadro II), así como también para ayudar preservar la inocuidad del producto durante el proceso.

Precalentamiento: Se calentaron 300 g de pulpa de zanahoria en un beaker durante 75 s (máxima potencia) en un microondas (modelo sbm7500W, Sunbeam, USA) con el fin de calentar la muestra hasta la temperatura de tratamiento enzimático.

Tratamiento enzimático: Se aplicó el tratamiento enzimático según el diseño experimental correspondiente. Se agregó el preparado enzimático disperso al 10 % (m/m) en jugo de zanahoria y se sumergieron las muestras en agua a una temperatura determinada durante un tiempo establecido; estas fueron agitadas manualmente de manera constante durante los

primeros 5 minutos y posteriormente cada 5 minutos hasta el final del periodo. En el caso de los tratamientos sujetos a las condiciones de tratamiento enzimático (tiempo y temperatura) donde no se agregó enzimas, se añadió un volumen de jugo de zanahoria equivalente a la cantidad de solución de enzimas al 10 % (m/m) que se agregó a las muestras correspondientes que involucraron un tratamiento enzimático.

Enfriamiento: Una vez finalizado el tiempo de tratamiento enzimático y previamente al prensado de la pulpa, se enfriaron las muestras en un baño de agua con hielo hasta una temperatura de 25 °C.

Prensado: Se prensó la pulpa de zanahoria para extraer el jugo mediante un analizador de textura según lo realizado por Sharma *et al.* (2005) (modelo TA-XT Plus Texture Analyzer, Stable Micro Systems, Inglaterra), con el fin de suministrar una compresión controlada en las muestras. Para ello se colocó la pulpa de zanahoria en una bolsa de manta de 10,0 cm de diámetro y 9,5 cm de alto sobre un recipiente plástico con agujeros (espaciados aproximadamente 1 cm) de 11 cm de diámetro y 10 cm de alto, el cual se ubicó sobre un recipiente para recolectar el jugo. Esta fue comprimida por un pistón de 10 cm de diámetro a una velocidad de prueba de 0,25 mm/s hasta una fuerza de 500 N, la cual se mantuvo constante por un tiempo de 120 s.

Nota: Las operaciones de precalentamiento y tratamiento enzimático no se realizaron en las muestras donde se extrajo el jugo de zanahoria por el método convencional (sin la aplicación de un tratamiento enzimático).

Flujo de proceso

Para la elaboración de jugo de zanahoria a nivel de laboratorio, que comprende la fabricación de la pulpa, la aplicación del tratamiento enzimático (cuando corresponde) y la extracción del jugo, se siguió el flujo de proceso que se presenta en la Figura 6.

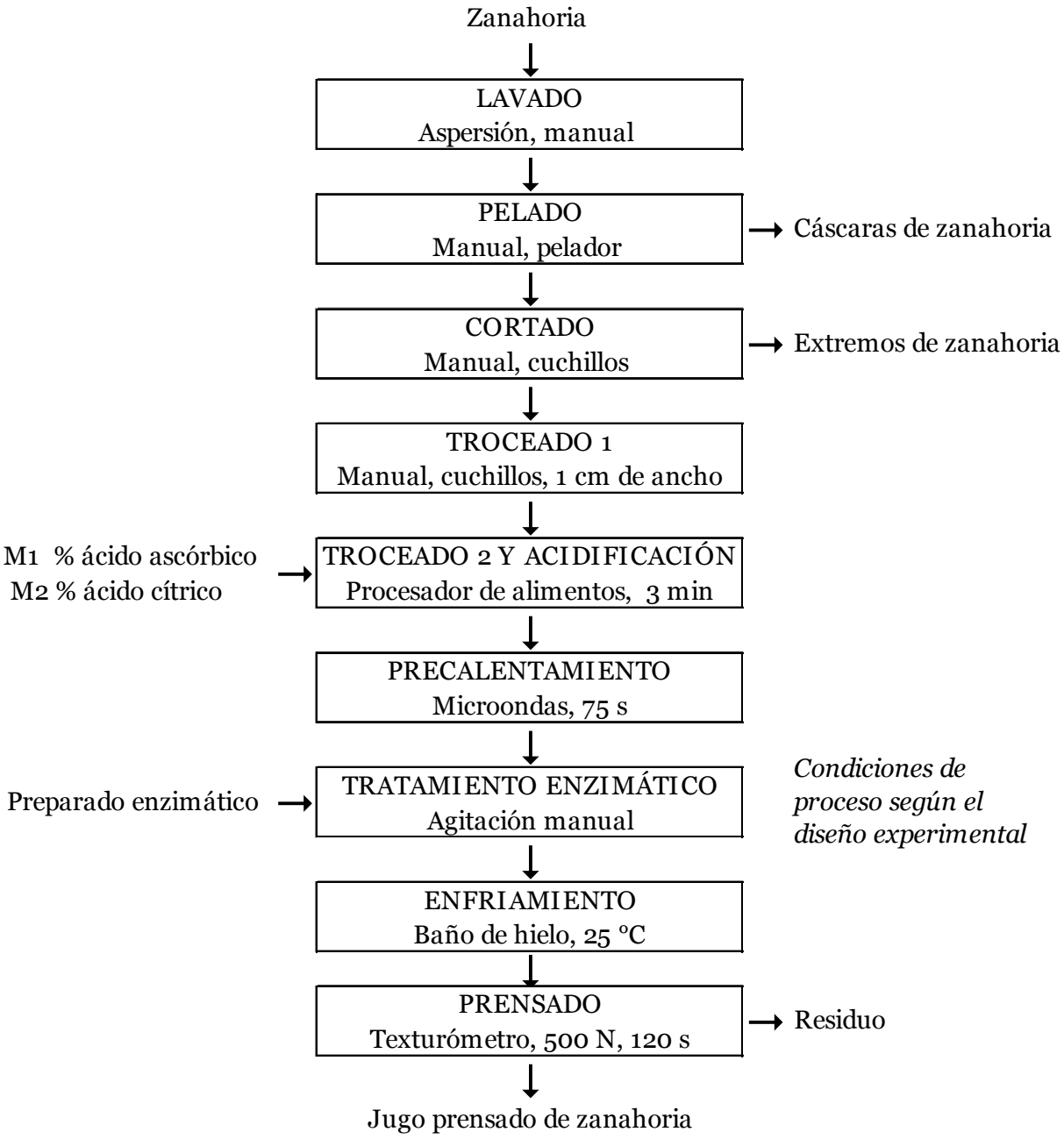

Figura 6. Flujo de proceso para la elaboración de jugo de zanahoria tratado enzimáticamente a nivel de laboratorio.

4.4.2.3 Escogencia del preparado enzimático más adecuado para maximizar el rendimiento de extracción de jugo de zanahoria

A partir de los resultados obtenidos, se seleccionó el preparado enzimático más adecuado para aumentar el rendimiento de extracción de jugo de zanahoria, para el cual posteriormente se optimizaron las condiciones de tratamiento enzimático. Los criterios principales fueron el rendimiento de extracción de jugo y el costo del preparado, sin embargo también se tomaron en cuenta las características físico-químicas evaluadas.

4.4.2.4 Análisis estadístico

Se calculó el promedio y el intervalo de confianza ($\alpha = 0,05$) de los datos obtenidos para cada uno de los parámetros evaluados. Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) cada variable respuesta, determinando con una $p < 0,05$ la existencia de diferencias significativas entre los parámetros evaluados para los distintos tratamientos; en los casos donde fue pertinente se realizó una prueba de comparación de medias de Tukey para determinar entre cuales tratamientos se obtuvo respuestas significativamente distintas. Se realizó además una prueba de Dunnett ($p < 0,05$), para determinar los procesos enzimáticos para los cuales se obtuvieron respuestas significativamente distintas al proceso control. Se utilizó el programa Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft Corporation©, USA) y JMP® versión 4.0.4 (SAS Institute Inc, USA).

4.4.3 Optimización de las condiciones de tratamiento enzimático para la extracción de jugo de zanahoria a nivel de laboratorio

4.4.3.1 Diseño experimental

Se utilizó la metodología de superficie de respuesta (MSR), empleando un diseño central compuesto rotable (DCCR) para ajustar un modelo de segundo orden. Los factores optimizados fueron la concentración de preparado enzimático: de -1,414 a 1,414 ppm y el tiempo de incubación: de -1,414 a 1,414 min (expresados como valores codificados), cada uno a cinco niveles tal como se muestra en el Cuadro IV. Se mantuvo constante la temperatura de tratamiento enzimático, la cual correspondió a T1 °C.

Cuadro IV. Variables y niveles para el diseño central compuesto rotable empleado para optimizar las condiciones de tratamiento enzimático para la extracción de jugo de zanahoria.

Variables estudiadas	**Niveles**				
Concentración de preparado enzimático (ppm)	-1,414	-1	0	1	1,414
Tiempo de tratamiento enzimático (min)	-1,414	-1	0	1	1,414

El ámbito de variación del tiempo de tratamiento enzimático se fijó con base en la factibilidad del proceso para la industria, que consideró aceptable un tiempo máximo de 1,414 min (expresado como valor codificado). Por otra parte, el ámbito de concentración se fijó tomando en cuenta que la dosificación recomendada para el procesamiento de jugo de zanahoria con el preparado enzimático seleccionado (P1) es de 200-300 ppm, lo cual es cercano al punto central del diseño; los límites de la región de interés se ajustaron por medio de pruebas preliminares, así como también el número de repeticiones en el punto central del diseño.

En el Cuadro V se presenta el diseño central compuesto rotable para la optimización del tratamiento enzimático según lo establecido por Montgomery (2008). Este consistió en 11 puntos experimentales: cuatro puntos factoriales (codificados como 1 y -1), cuatro puntos axiales o de estrella (cuya distancia al centro del diseño (α) es igual a $\pm\sqrt{2}$) (codificados como 1,414 y -1,414) y 3 repeticiones en el punto central (codificados como 0).

La principal variable respuesta fue el rendimiento de extracción de jugo, sin embargo también se determinó el pH, el contenido de sólidos solubles, de sólidos insolubles en suspensión, de sólidos totales, de carotenoides totales, el color y la turbidez del producto. El experimento se realizó a partir de un mismo lote homogéneo de materia prima y el orden de realización de los experimentos se determinó aleatoriamente.

Cuadro V. Matriz del diseño central compuesto rotable empleado para optimizar las condiciones de tratamiento enzimático para la extracción de jugo de zanahoria.

Número de prueba	Factores	
	Variables codificadas	
	Concentración del preparado enzimático (ppm)	Tiempo de incubación (min)
1	-1	-1
2	-1	1
3	1	-1
4	1	1
5	1,414	0
6	-1,414	0
7	0	1,414
8	0	-1,414
19	0	0
10	0	0
11	0	0

4.4.3.2 Elaboración del jugo de zanahoria

Para la obtención del jugo de zanahoria tratado enzimáticamente según el diseño experimental establecido, se utilizó la metodología descrita en la Figura 6.

4.4.3.3 Verificación de resultados

La adecuación de los modelos matemáticos generados para predecir el rendimiento de extracción de jugo de zanahoria y los demás parámetros físico-químicos evaluados fue verificada. Para esto se elaboró el jugo de zanahoria tratado enzimáticamente en dos condiciones de tiempo y concentración distintas, ubicadas dentro del campo experimental y no coincidentes con los puntos experimentales, siguiendo la metodología descrita en la Figura 6. Como variables respuesta fueron evaluados aquellos parámetros para los que se generó un modelo matemático válido.

El experimento se realizó a partir de un mismo lote homogéneo de materia prima y para cada punto se realizaron tres repeticiones. El orden de realización de los experimentos se determinó aleatoriamente.

4.4.3.4 Análisis estadístico

Para cada una de las variables respuesta evaluadas se propuso un modelo polinomial de segundo orden de la forma $Y = \beta_0 + \beta_1 * Cn + \beta_{11} * Cn^2 + \beta_2 * t + \beta_{22} * t^2 + \beta_{12} * Cn * t$, donde Y representa el valor de cada uno de los diferentes parámetros evaluados como respuesta, β_k los coeficientes de regresión del modelo, Cn y t la concentración de preparado enzimático y el tiempo de incubación respectivamente, como variables codificadas.

Inicialmente, para cada variable respuesta se determinaron los coeficientes de regresión del modelo y su significancia. Seguidamente se realizó un ANDEVA, considerando únicamente los coeficientes de regresión significativos ($p < 0,05$ o $0,10$ según el caso), y se determinó la ecuación que modela el comportamiento de la variable y los indicadores requeridos para su validación: el coeficiente de determinación (R^2), la probabilidad de la regresión (valor-P) y la probabilidad de falta de ajuste (P_{fa}); se evaluó además la distribución de los residuos.

Posteriormente, para cada variable respuesta predicha adecuadamente por el modelo generado, se elaboró la gráfica de contorno con el fin de facilitar la visualización de los resultados. Por último, se optimizó las condiciones de tratamiento enzimático en función de dos o más respuestas de real interés para la industria. Todo lo anterior se realizó empleando el programa Statistica 7 versión 7.0.61.0 (Statsoft®, USA).

Con respecto a la verificación de los resultados, se calculó el promedio y el intervalo de confianza ($\alpha = 0,05$) de los datos obtenidos para cada uno de los parámetros evaluados en cada punto experimental, y estos fueron comparados con los valores predichos por el modelo con su respectivo intervalo de confianza. Para esto se utilizó el programa Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft Corporation©, USA) y Statistica 7 versión 7.0.61.0 (Statsoft®, USA).

4.4.3.5 Escogencia de las condiciones óptimas de tratamiento enzimático

A partir de los resultados obtenidos en la optimización de las condiciones del tratamiento enzimático en función de las respuestas de interés, se seleccionaron las condiciones óptimas de tratamiento enzimático para la extracción de jugo de zanahoria de acuerdo a los requerimientos de la empresa.

4.4.4 Comparación de dos temperaturas de tratamiento enzimático sobre la extracción de jugo de zanahoria

Se comparó el rendimiento de extracción de jugo y algunas características físico-químicas de este, al realizar el tratamiento enzimático de pulpa de zanahoria bajo las condiciones optimizadas de tiempo y concentración de preparado enzimático óptimas determinadas, a 25 y T1 °C, donde T1 °C es mayor que 25 °C.

4.4.4.1 Diseño experimental

Mediante la aplicación de un diseño irrestricto aleatorio se evaluaron 3 tratamientos, con el fin de observar y comparar el rendimiento de extracción de jugo de zanahoria y las características físico-químicas del producto al extraer el jugo de manera convencional (sin aplicar ningún tratamiento enzimático), y al aplicar un tratamiento enzimático en condiciones de tiempo de incubación y concentración de enzimas definidas (valores óptimos obtenidos) a temperaturas de 25 y T1 °C.

Los tratamientos del diseño correspondieron a la extracción de jugo de zanahoria por el método convencional (número 1) y a la extracción de jugo de zanahoria mediante la aplicación de un tratamiento enzimático a diferentes temperaturas (números 2 y 3). Estos se muestran en el Cuadro VI.

Cuadro VI. Tratamientos evaluados para la comparación de dos temperaturas de tratamiento enzimático sobre la extracción de jugo de zanahoria.

Número de tratamiento	Descripción del tratamiento	
	Condiciones de tratamiento enzimático (tiempo / concentración)	Temperatura de tratamiento enzimático (°C)
1	No se aplicó	No se aplicó
2	X1 min / C1 ppm	25
3	X1 min / C1 ppm	T1

Para los tratamientos donde aplicó, se mantuvieron constantes las condiciones de tratamiento enzimático, tiempo de incubación: X1 min y concentración de preparado enzimático: C1 ppm; la principal variable respuesta fue el rendimiento de extracción de jugo, sin embargo, también se determinó el pH, el contenido de sólidos solubles, de sólidos insolubles en suspensión, de sólidos totales, de carotenoides totales, el color y la turbidez del producto.

El experimento se realizó a partir de un mismo lote homogéneo de materia prima y para cada tratamiento se realizaron tres repeticiones. El orden de realización de los experimentos se determinó aleatoriamente.

4.4.4.2 Elaboración del jugo de zanahoria

Para la obtención del jugo de zanahoria según el diseño experimental establecido, se utilizó la metodología descrita en la Figura 6.

4.4.4.3 Análisis estadístico

Se calculó el promedio y el intervalo de confianza ($\alpha = 0,05$) de los datos obtenidos para cada uno de los parámetros evaluados. Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) para cada variable respuesta, determinando con una $p < 0,05$ la existencia de diferencias significativas entre los parámetros evaluados para los distintos tratamientos; en los casos donde fue pertinente se realizó una prueba de comparación de medias de Tukey para determinar entre cuales tratamientos se obtuvieron respuestas significativamente distintas. Se utilizó el programa Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft Corporation©, USA) y JMP® versión 4.0.4 (SAS Institute, USA).

4.4.5 Implementación del proceso que involucra el tratamiento enzimático óptimo para la extracción de jugo de zanahoria a nivel de planta piloto

4.4.5.1 Descripción del experimento

Previo a la implementación del tratamiento enzimático óptimo como parte del proceso de fabricación de jugo de zanahoria en la industria, una vez definido el preparado enzimático más adecuado y las condiciones óptimas de proceso para obtener el jugo de zanahoria a nivel de laboratorio, se procedió realizar pruebas a nivel de planta piloto.

Para ello se partió de 3 muestras de aproximadamente 20 kg de zanahoria fresca (equivalentes aproximadamente a 15 kg de pulpa), provenientes de un mismo lote homogéneo. A partir de cada una de estas se elaboró el jugo de zanahoria aplicando el tratamiento enzimático en las condiciones previamente definidas en la etapa de optimización: tiempo X1 min y concentración de enzimas C1 ppm, a una temperatura de T1±2 °C. Como variable respuesta se determinó el rendimiento de extracción de jugo.

4.4.5.2 Elaboración del jugo de zanahoria

Para la obtención del jugo de zanahoria a nivel de planta piloto, se utilizó la metodología descrita en la Figura 6 con las siguientes modificaciones:

- El precalentamiento se llevó a cabo en una marmita de vapor hasta alcanzar la temperatura requerida.
- El tratamiento enzimático se llevó a cabo en una marmita de vapor de 40 L con agitación mecánica constante.
- No se realizó la etapa de enfriamiento, por lo que la pulpa fue prensada en caliente.
- El prensado se realizó en dos tandas (de aproximadamente 8 kg de pulpa cada una) utilizando una prensa hidráulica (modelo OTC 25 Ton, Hydraulic Shop Press), a una presión de 10.000 kPa durante 10 min, empleando un filtro de tela.

4.4.5.3 Análisis estadístico

Se calculó el promedio y el intervalo de confianza ($\alpha = 0,05$) de los datos obtenidos para cada parámetro evaluado. Se realizó además, una prueba t de Student para la variable respuesta, determinando con una $p < 0,05$ la existencia de diferencias significativas entre los resultados obtenidos a nivel de planta piloto y de laboratorio. Se utilizó el programa Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft Corporation©, USA) y JMP® versión 4.0.4 (SAS Institute, USA).

4.4.6 Implementación del proceso que involucra el tratamiento enzimático óptimo para la extracción de jugo de zanahoria a nivel industrial

4.4.6.1 Descripción del experimento

A partir de las condiciones definidas para el tratamiento enzimático para obtener el jugo de zanahoria, luego de los ensayos de implementación a nivel piloto, se realizaron pruebas a escala industrial, con el fin de implementar el tratamiento enzimático óptimo como una operación eficaz dentro del proceso de elaboración de jugo de zanahoria en la industria.

Previamente a las pruebas de implementación como tales, se visitó la empresa para acoplar a la línea de producción el equipo necesario para poder llevar a cabo el tratamiento enzimático, específicamente un tanque con calentamiento y agitación; así como también para evaluar la necesidad de nuevos instrumentos de medición y agitación. Además, se definió junto con los

operarios del proceso, la logística a seguir para la realización de las pruebas, especialmente en cuanto al trasiego del producto de una etapa a otra durante el proceso.

Para la implementación del proceso a nivel industrial, se partió de 3 muestras de aproximadamente 200 kg de zanahoria pelada, provenientes de lotes distintos, las cuales fueron divididas en dos sub-muestras de 100 kg: denominadas “A” y “B”. A partir de las sub-muestras “A” se elaboró el jugo de zanahoria aplicando el tratamiento enzimático en las condiciones previamente definidas en la etapa de optimización: tiempo X1 min y concentración de enzimas C1 ppm de P1, a una temperatura de T1 °C. En el caso de las sub-muestras “B”, se elaboró el jugo de zanahoria de manera convencional (sin aplicar ningún tratamiento enzimático, según lo realiza actualmente la industria) y luego este fue acidificado añadiendo M1 % de ácido cítrico, para posteriormente comparar los jugos en iguales condiciones. Ambos procesos se pueden visualizar de manera general en la Figura 7.

4.4.6.2 Caracterización de materia prima

Se determinó el pH, el color, el contenido de sólidos solubles, de carotenoides totales y de sólidos totales para cada lote homogéneo de materia prima.

4.4.6.3 Caracterización del proceso

Se determinó el rendimiento de ambos procesos de extracción de jugo de zanahoria mediante la relación entre la masa de la zanahoria pelada y el jugo de zanahoria obtenido luego de la molienda de las zanahorias, la aplicación del tratamiento enzimático (en las pruebas donde fue pertinente) y el prensado de la pulpa.

4.4.6.4 Caracterización de producto terminado

Se determinó el pH, el color, la turbidez, la estabilidad relativa a la turbidez, el contenido de sólidos solubles, de sólidos insolubles en suspensión, de carotenoides totales y de sólidos totales para cada lote homogéneo de producto terminado.

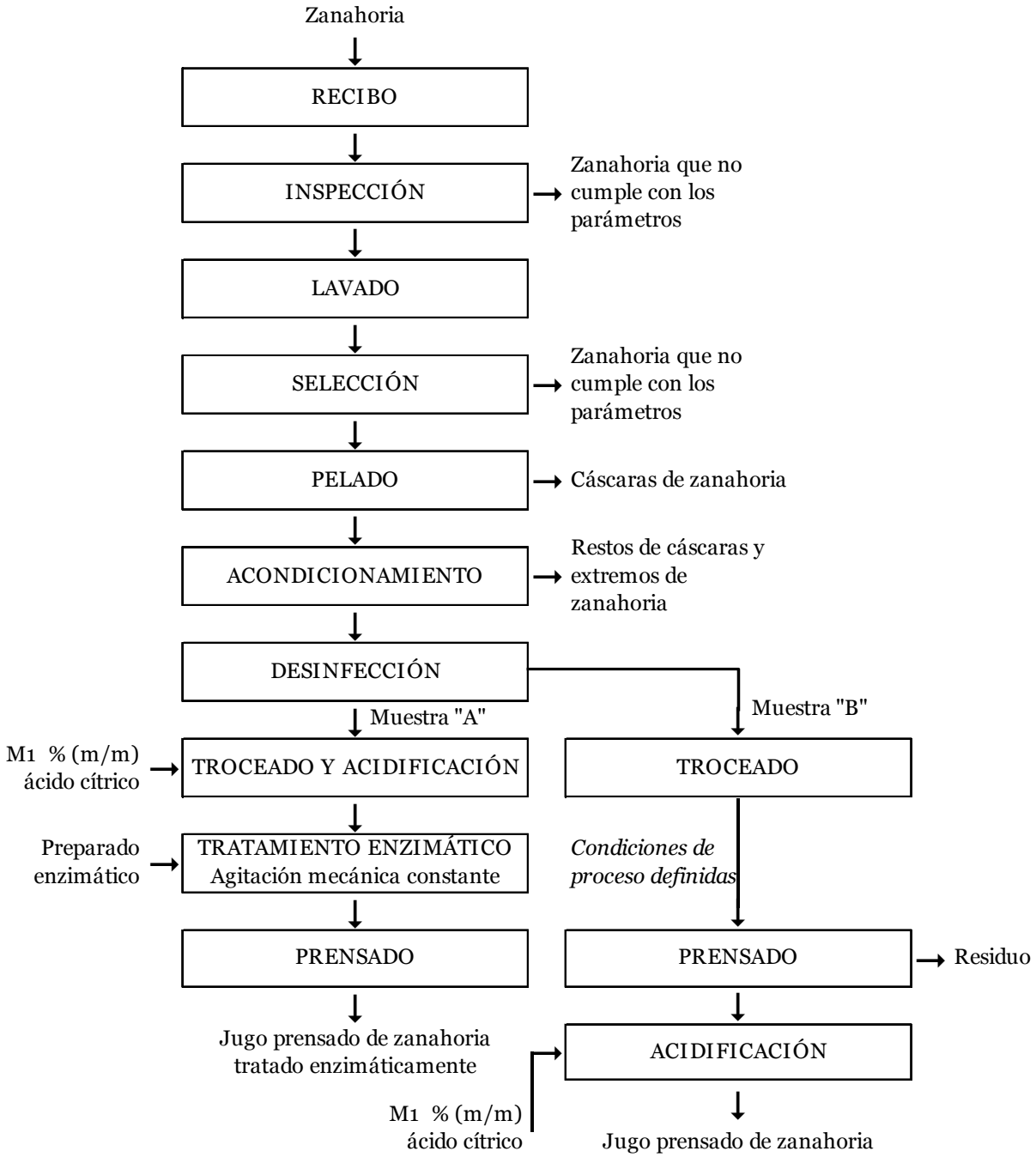

Figura 7. Flujo de proceso general para la elaboración de jugo de zanahoria mediante el proceso convencional y tratado enzimáticamente a nivel industrial.

4.4.6.5 Determinación de la preferencia del consumidor por el jugo de zanahoria tratado o no tratado enzimáticamente con base en su color

Como complemento a la diferencia de color instrumental observada entre el jugo de zanahoria tratado enzimáticamente y el procesado de manera convencional, elaborados a nivel industrial, se realizó una evaluación sensorial con el fin de determinar la preferencia del consumidor entre ambos productos con base en su color.

Para ello se contó con 75 jueces, consumidores de jugo de zanahoria o de naranja con zanahoria. Las muestras utilizadas para la prueba consistieron en jugo de zanahoria tratado enzimáticamente y producido de manera convencional, ambos pasteurizados (por lote, a 80 °C durante 15 s) y provenientes de una de las tres pruebas realizadas a escala industrial; estas fueron presentadas en vasos de vidrio transparentes llenos hasta ¾ partes (con 100 mL de producto), codificadas y ordenadas de manera aleatoria y balanceada para presentarlas a los panelistas.

La prueba se realizó en una cabina para evaluación sensorial equipada con luz blanca. Al ingresar el panelista, se le entregó una bandeja con las dos muestras, una hoja para evaluación y un lápiz; se le indicó que observaba dos muestras de jugo de zanahoria 100 % natural, obtenido mediante diferentes procesos, y se le solicitó evaluar visualmente las muestras de izquierda a derecha en el orden presentado e indicar su preferencia según el color, marcando con una "X" en una de tres casillas: prefiere la muestra A, prefiere la muestra B o no prefiere ninguna muestra debido a que ambas le agradan.

4.4.6.6 Análisis estadístico

Se calculó el promedio y el intervalo de confianza ($\alpha = 0,05$) de los datos obtenidos para cada uno de los parámetros evaluados. Se realizó un ANDEVA o una prueba t de Student (según correspondió) para comparar las características físico-químicas de la materia prima y ambos productos terminados, determinando con una $p < 0,05$ la existencia de diferencias significativas. Se utilizó el programa Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft Corporation©, USA) y JMP® versión 4.0.4 (SAS Institute Inc, USA).

Para el análisis de los datos obtenidos en la prueba de preferencia, se realizó una prueba binomial, determinando el número mínimo de respuestas coincidentes necesarias para

establecer significancia a una p = 0,001 para una prueba de preferencia de pares (dos colas, p = ½) según las tablas presentadas por Roessler *et al.* (1978).

4.5 MÉTODOS DE ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICOS

4.5.1 Determinación del rendimiento de extracción de jugo

Se determinó como porcentaje masa/masa del jugo obtenido a partir de la masa de pulpa inicial mediante la siguiente fórmula:

$$Rendimiento\ (\%\ m/m) = \frac{Masa\ de\ jugo}{Masa\ de\ pulpa} * 100 \qquad (1)$$

4.5.2 Determinación de sólidos solubles

Se determinó según el método AOAC 932.12 (AOAC, 2005a) empleando un refractómetro de Abbé. La medición se realizó a 20 °C y se obtuvo los resultados en términos de grados Brix.

4.5.3 Determinación de pH

Se determinó según el método AOAC 981.12 (AOAC, 2005b).

4.5.4 Determinación de sólidos insolubles en suspensión

Se determinó con base en el método descrito por Vaillant *et al.* (2008). Se pesaron 20 mL de muestra a 4 °C en un tubo de centrífuga y se centrifugó a 3900 g durante 20 min, posteriormente se decantó el líquido supernatante y se escurrió el tubo durante 1 min, por último se pesó el residuo correspondiente a la masa de sólidos insolubles en suspensión. El porcentaje se calculó por medio de la siguiente fórmula:

$$Sólidos\ insolubles\ en\ suspensión\ (\%\ m/m) = \frac{Masa\ de\ sólidos\ insolubles}{Masa\ de\ muestra} * 100 \qquad (2)$$

4.5.5 Determinación de turbidez

Se determinó por medio de un turbidímetro (modelo 2100 AN, HACH, USA). Se diluyó la muestra en una proporción 1:10 en agua destilada y se colocaron 30 mL de disolución homogénea a 20 °C en la celda del equipo, esta se agitó levemente 4 veces y se colocó en el soporte, la lectura fue tomada a los 30 segundos y posteriormente se aplicó el factor de dilución. Los resultados se expresaron en Unidades Nefelométricas de Turbidez (NTU por sus siglas en inglés).

4.5.6 Determinación de estabilidad relativa a la turbidez

Se determinó con base en el método descrito por Reiter *et al.* (2003). Se midió un volumen de 50 mL de muestra a 4 °C en un tubo de centrífuga y se centrifugó a 3900 g durante 10 min, posteriormente se decantó el líquido supernatante y se midió su turbidez según el método descrito en la sección 4.5.5. También se midió la turbidez del jugo antes de centrifugar y se calculó la estabilidad a la turbidez como un valor relativo según la siguiente ecuación:

$$Estabilidad\ a\ la\ turbidez = \frac{Turbidez\ después\ de\ centrifugar\ (NTU)}{Turbidez\ antes\ de\ centrifugar\ (NTU)} * 100 \qquad (3)$$

4.5.7 Determinación de color

Se determinó empleando un colorímetro (modelo 45/0, HunterLab Color Flex, USA, fuente iluminante D65) utilizando la escala CIELCh para obtener los parámetros L^*, C^* y H^o respectivamente. Estos fueron medidos con un ángulo de visión de 10° y un ángulo de incidencia de la fuente de luz sobre la muestra de 45°, se colocó en la cubeta un volumen de muestra aproximadamente de 30 mL.

La escala CIELab está organizada en forma de cubo. El eje L^* se extiende de arriba hacia abajo y presenta un valor máximo de 100, que representa un difusor que refleja la luz perfectamente y un valor mínimo de 0, que representa el color negro. Los ejes a^* y b^* no tienen límites numéricos específicos, el a^* se extiende de rojo ($+a^*$) hasta verde ($-a^*$) y el b^* de amarillo ($+b^*$) hasta azul ($-b^*$) (HunterLab, 2008a).

Por otra parte, la escala CIELCh es una escala aproximadamente uniforma con un espacio de color polar. El ángulo de tono o *Hue* (H^o) es 0° a lo largo del eje $+a^*$; 90°, 180° y 270° a lo largo de los ejes $+b^*$, $-a^*$ y $-b^*$ según corresponde, el parámetro *Chroma* (C^*) representa la pureza del color (Marcus, 1999; HunterLab, 2008b). Ambos parámetros se calculan a partir de a^* y b^* según las siguientes ecuaciones (HunterLab, 2008a).

$$H^* = tan^{-1}(b^*/a^*) \qquad (4)$$

$$C^* = \sqrt{(a^{*2} + b^{*2})} \qquad (5)$$

También existen cambios asociados con las escalas de color, estos indican qué tanto un estándar y una muestra difieren entre sí para cada parámetro de color evaluado. Además, la diferencia total de color puede ser calculada; este es un valor único que toma en cuenta las

diferencias entre los parámetros L^*, a^* y b^* de un estándar y una muestra. Dichos cambios o diferencias, se calculan según las siguientes ecuaciones (HunterLab, 2008a).

$$\Delta L^* = L^* muestra - L^* estándar \quad (6)$$

$$\Delta a^* = a^* muestra - a^* estándar \quad (7)$$

$$\Delta b^* = b^* muestra - b^* estándar \quad (8)$$

$$\Delta E^* = \sqrt{\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}} \quad (9)$$

$$\Delta C^* = C^* muestra - C^* estándar \quad (10)$$

$$\Delta H^* = \sqrt{\Delta E^{*2} + \Delta L^{*2} + \Delta C^{*2}} \quad (11)$$

4.5.8 Determinación de humedad

Se determinó según el método P-SA-MQ-002 basado en el método AOAC 920.151 (AOAC, 2005c).

4.5.9 Determinación de carotenoides totales

La cuantificación del contenido de carotenoides totales, expresados como beta caroteno, se realizó por espectrofotometría (Rodríguez-Amaya & Kimura, 2004). La extracción de la muestra se realizó según el método empleado por Philip & Chen (1988) con algunas modificaciones.

Equipo

Se utilizó un espectrofotómetro UV-visible (modelo Pharma Spec UV-1700, Shimadzu, Japan), una balanza analítica, un homogeneizador (Ultra Turrax modelo Pro 200, Pro Scientific, USA), un procesador de alimentos (modelo fp 41, Hobart, USA), embudos separadores de 250 mL, balones aforados de 100 mL, erlenmeyers de 250 mL, probetas de 1L y 100 mL, embudos de plástico, papel filtro Whatman No. 4, kitasatos, embudos de büchner, beakers de diferentes tamaños, papel aluminio, agitadores de vidrio, espátulas acanaladas, goteros y cubetas para el espectrofotómetro.

Reactivos

Se utilizó metanol, éter de petróleo (35-60 °C) y acetona grado ACS; carbonato de magnesio ($MgCO_3$) y sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4) grado reactivo para análisis.

Procedimiento

1. Se homogenizó la muestra mediante agitación o con un procesador de alimentos según la naturaleza líquida o sólida de esta.
2. Se pesó en un beaker de 150 mL 2,0 g de muestra y 1,0 g de $MgCO_3$.
3. Se agregó 60 mL de metanol.
4. Se homogenizó la muestra con el metanol mediante un Ultra Turrax a velocidad máxima durante 1 min.
5. Se filtró la muestra al vacío sobre un embudo de Büchner con un papel filtro Whatman No. 4 colocado sobre un kitasato.
6. Se lavó el beaker y el residuo 5 veces con 20 mL de una mezcla de acetona y éter de petróleo (en proporción 60:40).
7. Se transvasó cuantitativamente el filtrado a un embudo separador de 250 mL. Se lavó el kitasato con 3 porciones de aproximadamente 10 mL de mezcla de acetona y éter de petróleo y se transvasó los lavados al embudo separador.
8. Se agregó al embudo separador 75 mL de agua destilada.
9. Se dejó en reposo el embudo separador hasta observar la separación de las fases.
10. Se extrajo y descartó la fase acuosa.
11. Se agregó al embudo separador 50 mL de agua destilada y se repitió los puntos 9 y 10.
12. Se repitió el punto 11.
13. Se vertió la fase etérea en un erlenmeyer de 250 mL. Se lavó el embudo separador con 3 porciones de 10 aproximadamente mL de éter de petróleo, se transvasó los lavados al erlenmeyer.
14. Se agregó Na_2SO_4 (cantidad necesaria) y se dejó la muestra en reposo con agitación ocasional durante aproximadamente 10 min.
15. Se filtró el extracto etéreo sobre un embudo con papel Whatman No. 4 y se recogió el filtrado en un balón aforado de 100 mL. Se lavó el erlenmeyer con el desecante con 3 porciones de aproximadamente 10 mL de éter de petróleo y se trasvasó los lavados al embudo.
16. Se lavó el papel filtro con éter de petróleo hasta eliminar por completo el color.
17. Se aforó el balón con éter de petróleo.
18. Se midió la absorbancia de la disolución a una longitud de onda de 450 nm, se utilizó como blanco éter de petróleo.

Nota: A lo largo de todo el procedimiento se cubrió la cristalería con papal aluminio para proteger la muestra de la luz.

Cálculos

Se determinó la cantidad de carotenoides totales en la muestra según la siguiente ecuación:

$$\mu g\ beta\ caroteno/g\ muestra = \frac{A * 10^6}{A^{1\%} * m} \qquad (12)$$

Donde $A^{1\%}$ es la absorbancia de una disolución al 1 % de beta caroteno en éter de petróleo: 2592 (Rodríguez-Amaya & Kimura, 2004), A la absorbancia de la muestra y m la masa de la muestra.

4.5.10 Determinación de proteína

Se determinó según el método P-SA-MQ-003 basado en el método AOAC 920.152 (AOAC, 2005d). Esta fue calculada como N*6,25.

4.5.11 Determinación de lípidos

Se determinó según el método P-SA-MQ-005 basado en el método establecido por Carpenter *et al.* (1993).

4.5.12 Determinación de cenizas

Se determinó según el método P-SA-MQ-004 basado en el método AOAC 940.26 (AOAC, 2005e).

4.5.13 Determinación de carbohidratos totales

Se determinó por diferencia según la siguiente fórmula:

$$Carbohidratos\ totales\ (\%\ m/m) = 100 - \%\ H - \%\ L - \%\ P - \%\ C \qquad (13)$$

Donde % H, % L, % P y % C corresponden a los porcentajes (m/m) de humedad, lípidos, proteínas y cenizas respectivamente.

4.5.14 Determinación de fibra dietética

Se determinó según el método P-SA-MQ-007 basado en el método AOAC 985.29 (AOAC, 2005f).

4.5.15 Determinación de carbohidratos disponibles

Se determinó según la siguiente fórmula:

$$Carbohidratos\ disponibles\ (\%\ m/m) = \%\ CT - \%\ FD \qquad (14)$$

Donde % CT y % FD corresponden a los porcentajes (m/m) de carbohidratos totales y fibra dietética respectivamente.

4.5.16 Determinación de acidez titulable

Se determinó según el método P-SA-MQ-011 basado en el método AOAC 942.15 (AOAC, 2005g).

4.5.17 Determinación de polifenoles totales

Se determinó por espectrofotometría usando el reactivo Folin-Ciocalteu según el método AQCITA-M036 basado en el método reportado por George *et al.* (2005).

4.5.18 Determinación de azúcares totales

Se determinó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) según el método P-SA-MQ-006 basado en el método reportado por Pirisino (1983), utilizando una columna Phenomenex NH_2.

4.5.19 Determinación de capacidad antioxidante

Se determinó por espectrofluorometría según el método P-SA-MQ-037 basado en los métodos reportados por Ou *et al.* (2001) y Huang *et al.* (2002).

4.5.20 Condiciones de almacenamiento de las muestras

Para la determinación de sólidos solubles, sólidos insolubles en suspensión, turbidez, pH, color y carotenoides totales, las mediciones se realizaron en muestras en estado fresco; en el caso de la estabilidad relativa a la turbidez, en muestras pasteurizadas (por lote, a 80 °C durante 15 s). Para los demás análisis, las determinaciones se realizaron en muestras almacenadas en bolsas Doy Pack metalizadas a -20 °C. Todas las muestras fueron homogenizadas previamente a su análisis.

4.5.21 Número de réplicas realizadas para cada análisis

Para la determinación de sólidos solubles, sólidos insolubles en suspensión, turbidez, estabilidad relativa a la turbidez, pH y color los análisis se realizaron por triplicado. Para los demás análisis se realizaron dos réplicas.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 CARACTERIZACIÓN DEL PROCESO CONVENCIONAL DE FABRICACIÓN DE JUGO DE ZANAHORIA A NIVEL INDUSTRIAL

Durante los meses de febrero, marzo y abril del 2011, se realizó la caracterización física y química de la zanahoria empleada como materia prima y del jugo de zanahoria producido a nivel industrial mediante el proceso convencional. Se caracterizó también el proceso de producción, por medio de la cuantificación del rendimiento de extracción de jugo.

Composición proximal

En el Cuadro VII se presenta la composición proximal de la zanahoria fresca y el jugo de zanahoria fabricado a nivel industrial mediante el proceso convencional.

Cuadro VII. Composición proximal de la zanahoria empleada como materia prima y del jugo de zanahoria fabricado a nivel industrial mediante el proceso convencional*.

Parámetro evaluado		Zanahoria fresca	Jugo de zanahoria
Humedad (g/100 g)		88±3[b]	92,6±0,4[a]
Carbohidratos totales (g/100 g)		10±2[a]	5,9±0,4[b]
Carbohidratos disponibles (g/100 g)		7±1	5,3±0,6
Fibra dietética (g/100 g)		3,4±0,9[a]	0,6±0,1[b]
Proteína (g/100 g)		0,8±0,1	0,7±0,1
Cenizas (g/100 g)		0,8±0,1[a]	0,63±0,03[b]
Lípidos (g/100 g)		0,23±0,06[a]	0,1±0,0[b]
Azúcares totales (g/100 g)	Sacarosa	3±1	2,1±0,4
	Glucosa	1,3±0,2	1,7±0,3
	Fructosa	0,93±0,06[b]	1,5±0,4[a]

*Datos reportados como promedio ± intervalo de confianza (n = 3) con un nivel de confianza del 95 %. Dentro de una misma fila, promedios con diferente letra son significativamente distintos (Prueba-t, p < 0,05). Análisis realizados por el Laboratorio de Química del CITA.

La zanahoria está constituida principalmente por agua. Además de este componente, los carbohidratos totales constituyen la fracción más importante; contrariamente, las proteínas, los lípidos y las cenizas, se encuentran en baja cantidad. Con base en la revisión de varios estudios, Sharma *et al.* (2010) reportaron que la zanahoria puede contener entre 86-89 % de

humedad, 6,0-10,6 % de carbohidratos, 0,7-1,1 % de proteína, 0,2-0,5 % de lípidos, 1,2-2,4 % de fibra cruda y 1,1 % de cenizas.

Dichos autores no hacen referencia a la variedad de zanahorias ni a las zonas de cultivo. Sin embargo, es posible observar que los promedios de los resultados obtenidos para la zanahoria fresca variedad Bangor, cosechada en la zona de Zarcero, Costa Rica, se encuentran dentro o son cercanos a los intervalos o valores reportados por Sharma *et al.* (2010).

Tomando como base los resultados presentados en el Cuadro VII, en la Figura 8 se presenta la composición química de la zanahoria y del jugo expresada en base seca, con el principal objetivo de ilustrar los cambios que ocurren en los componentes de la zanahoria cuando el jugo es extraído mediante el proceso convencional. En el Cuadro A I se presentan resultados obtenidos.

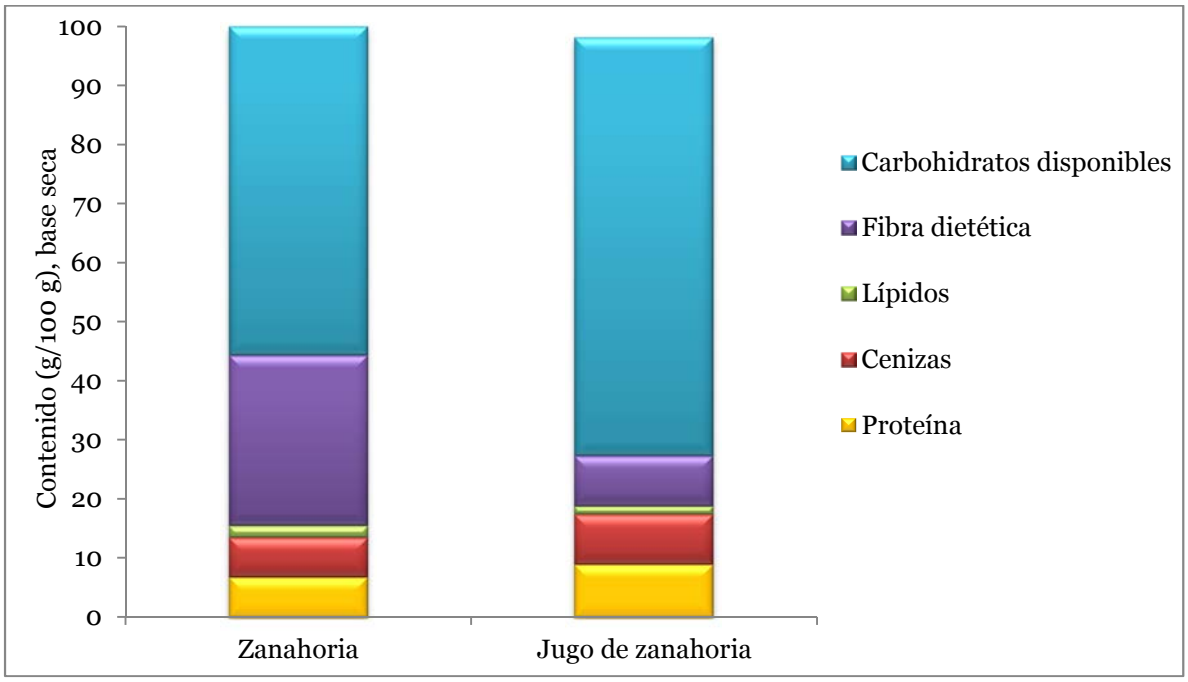

Figura 8. Composición química de la zanahoria empleada como materia prima y del jugo de zanahoria fabricado a nivel industrial mediante el proceso convencional, expresada en base seca.

Los carbohidratos totales representan los componentes mayoritarios de la materia seca, tanto de la zanahoria como del jugo, 84±2 y 79±2 % (m/m) según corresponde. En los alimentos vegetales, estos pueden ser clasificados como digeribles y no digeribles. Los primeros, hacen

alusión a los monosacáridos, disacáridos y oligosacáridos con enlaces α y al almidón, los cuales son hidrolizados por las enzimas digestivas humanas y absorbidos en el tracto gastrointestinal (Khanna *et al.*, 2006).

Los carbohidratos no digeribles, los cuales pueden ser categorizados como fibra dietética, incluyen los polisacáridos no almidonados, los disacáridos y oligosacáridos con enlaces β y el almidón resistente. Estos no pueden ser hidrolizados por las enzimas digestivas humanas y por lo tanto no son absorbidos en el tracto gastrointestinal (Khanna *et al.*, 2006).

Con base en estudios nutricionales, se ha establecido que es beneficioso ingerir un mínimo de 30 g diarios de fibra (*American Institute for Cancer Research*, 2001). De acuerdo con *American Diabetes Association & American Dietetic Association* (2008), la zanahoria es un alimento alto en fibra, dado que contiene más de 3 g por porción, lo que corresponde en crudo según USDA (s.f.) a 110 g. Se ha reportado el siguiente contenido de fibra en vegetales crudos: brócoli 2,61 g/100 g, repollo 2,29 g/100 g, coliflor 2,50 g/100 g, apio 1,58 g/100 g, lechuga 1,25 g/100 g, hongos 1,14 g/100 g, espinacas 2,33 g/100 g, tomate rojo maduro 1,22 g /100 g y zanahoria 2,82 g/100 g, siendo este último el vegetal con mayor contenido (USDA, s.f).

La fibra dietética en la zanahoria se compone en su mayor parte de polisacáridos de la pared celular (Kotcharian *et al.*, 2004) y contiene pectinas altamente ramificadas (45 %), altamente metiladas y débilmente acetiladas (arabinogalactanos, galactanos lineales y arabinanos); celulosa (25 %) y hemicelulosa (xiloglucanos, xilanos y mananos) (Reed & Nagodawithana, 1995). Debido a la alta proporción de pectina que contiene la pared celular de la zanahoria, en el presente estudio, con el objetivo de aumentar el rendimiento de extracción de jugo, se eligieron preparados enzimáticos con actividad pectinolítica.

De la fracción total de carbohidratos, el jugo de zanahoria posee una mayor cantidad de carbohidratos disponibles y una menor cantidad de fibra dietética, en comparación con la zanahoria fresca. Esto es esperado debido a que durante el proceso de extracción, al mismo tiempo que se produce el jugo, se genera un residuo alto en sólidos que posee un alto contenido de fibra dietética (Sharma *et al.*, 2005). Este residuo en la industria evaluada representa aproximadamente un 49 % (m/m), ver Cuadro IX.

Por otra parte, es reconocido que la fructosa, la glucosa y la sacarosa, son los principales azúcares presentes en la zanahoria, y extensa investigación se ha publicado con respecto al

contenido de estos en distintas variedades (Soria *et al.*, 2009). En el caso de estudio, se encontró un mayor contenido de sacarosa, seguido por glucosa y fructosa, tanto en la zanahoria fresca como en el jugo; y un contenido de azúcares totales entre 4-6 % (m/m) y 5,0-5,6 % (m/m) según corresponde. Sharma *et al.* (2010) reportaron un contenido de azúcares totales en zanahoria de 5,6 % (m/m).

Seguidamente, en el Cuadro VIII, se presentan otras propiedades físicas y químicas evaluadas en la zanahoria fresca y el jugo.

Cuadro VIII. Propiedades físicas y químicas de la zanahoria empleada como materia prima y del jugo de zanahoria fabricado a nivel industrial mediante el proceso convencional†.

Parámetro evaluado		**Zanahoria fresca**	**Jugo de zanahoria**
Sólidos solubles (°Brix)		8,8±0,3[a]	7,7±0,4[b]
pH		6,3±0,1	6,29±0,08
Acidez (g/100 g) (expresada como ácido cítrico)**		0,06±0,02	0,13±0,07
Carotenoides totales (µg β-caroteno/g muestra)	Base húmeda	129±16	115±7
	Base seca	1102±114[b]	1542±68[a]
Capacidad antioxidante (H-ORAC) (µmol equivalentes de trolox/g muestra)**	Base húmeda	2,7±0,6	2,9±1,0
	Base seca	23±8	39±14
Polifenoles (mg equivalentes de ácido gálico/g muestra)**		ND***	ND***
Color	*L**	52±1[a]	50,1±0,8[b]
	*C**	70±1[a]	65±1[b]
	H°	55,6±0,8	55,7±0,6
Sólidos insolubles en suspensión (% m/m)		NA	12±4
Turbidez (NTU)		NA	11236±320

†Datos reportados como promedio ± intervalo de confianza (n = 3) con un nivel de confianza del 95 %. Dentro de una misma fila, promedios con diferente letra son significativamente distintos (Prueba-t, $p < 0,05$). **Análisis realizados por el Laboratorio de Química del CITA. ***Menor a 3,028 mg equivalentes de ácido gálico/g de muestra. NA: No aplica. ND: No detectable.

pH, acidez y sólidos solubles

La zanahoria posee un pH cercano a 6 unidades y una baja acidez, parámetros que no se ven significativamente afectados por el proceso de transformación en jugo. Sharma *et al.* (2010) mencionan la presencia de ácido glutámico en la zanahoria, el cual, junto con la acción tampón de aminoácidos libres, le confiere su sabor característico. Asimismo, se ha encontrado en esta, trazas de ácido succínico, α-cetoglutárico, láctico y glicólico (Sharma *et al.*, 2010).

Los sólidos solubles, determinados como °Brix, están compuestos principalmente por fructosa, sacarosa y glucosa (Sun *et al.*, 2007), así como también por ácidos orgánicos (Shachman, 2005). En este caso se encontró una cantidad levemente mayor de sólidos solubles en la zanahoria fresca en comparación con el jugo, a pesar de esto, el contenido de azúcares totales fue muy similar.

Carotenoides totales

En cuanto al contenido de carotenoides totales, expresado como β-caroteno, se obtuvo para la zanahoria fresca valores dentro del rango reportado por Gregory (1996) para la concentración de β-caroteno en este vegetal: entre 980 y 1860 μg β-caroteno/g muestra, en base seca; y reportado por Sharma *et al.* (2010) para el contenido de carotenoides totales: de 60 a 540 μg β-caroteno/g muestra (ver Cuadro VIII).

Este parámetro fue mayor para el jugo de zanahoria que para la zanahoria fresca, lo que posiblemente se debe a que el procesamiento propicia la disociación de los carotenoides de los componentes de la matriz de la planta (Kalt, 2005), y por lo tanto, es más fácil realizar las extracción de estos durante la determinación analítica (Rodríguez-Amaya & Kimura, 2004).

Es importante mencionar que varios factores influyen en el contenido de carotenoides en los alimentos, entre los que se encuentran la variedad, la parte de la planta, el estado de madurez, el clima y el lugar geográfico de producción, el manejo en cosecha y poscosecha, el procesamiento y el almacenamiento (Rodríguez-Amaya, 2001); así como también la aplicación de pesticidas y fertilizantes (von Elbe & Schwartz, 1996).

Capacidad antioxidante y polifenoles totales

La capacidad antioxidante fue determinada por el método *Oxygen Radical Absorbance Capacity*, ORAC por sus siglas en inglés. Una limitación de este método es la inhabilidad para determinar los antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos simultáneamente (Prior *et al.*, 2003). En el caso del presente estudio, se determinó la capacidad antioxidante de los compuestos hidrofílicos (H-ORAC); que es un parámetro que no fue afectado por el proceso de transformación de zanahoria en jugo (Cuadro VIII).

La zanahoria ha sido conocida como una buena fuente de antioxidantes naturales, incluyendo carotenoides, vitaminas, compuestos fenólicos y flavonoides (Chantaro *et al.*, 2008). El valor

obtenido para la zanahoria fresca (2,7±0,6 µmol equivalentes de trolox/g de muestra), se encuentra dentro del rango reportado para zanahoria cruda por Haytowitz & Bhagwat (2010), entre 1,07 y 14,05 µmol equivalentes de trolox/g, con un promedio de 6,49 µmol equivalentes de trolox/g. En el caso de la capacidad antioxidante de los compuestos lipofílicos (L-ORAC), se reporta un contenido ente 0,05 y 0,80 µmol equivalentes de trolox/g (Haytowitz & Bhagwat, 2010).

En contraste, para el chile dulce rojo crudo se reporta un valor promedio de H-ORAC y L-ORAC de 7,97 y 0,24 µmol equivalentes de trolox/g según corresponde, para el tomate rojo maduro crudo de 3,64 y 0,23 µmol equivalentes de trolox/g y para la sandía, 1,23 y 0,19 µmol equivalentes de trolox/g (Haytowitz & Bhagwat, 2010).

Por otra parte, la concentración de polifenoles tanto en zanahoria como en jugo fue menor a 3,028 mg de equivalentes de ácido gálico/g de muestra (no detectable según el método empleado). Contrario a esto, se ha reportado que la zanahoria es una buena fuente de compuestos fenólicos (Chantaro *et al.*, 2008) y que entre ellos predomina el ácido caféico (Sharma *et al.*, 2010). Se ha reportado además, que particularmente el contenido de antocianinas en zanahorias, puede variar de cantidades traza en variedades rosadas a 1750 mg/kg en zanahoria negra (Sharma *et al.*, 2010).

Color

La zanahoria se caracteriza por su color anaranjado intenso, que se puede atribuir a la presencia de carotenoides (von Elbe & Schwartz, 1996). El parámetro *H°* o *Hue*, es el primero a tomar en cuenta para la identificación del color que se percibe, al ser este aproximadamente 56, como se observa en el Cuadro VIII, sin diferencias estadísticas para la zanahoria y el jugo, se afirma que ambos se perciben de color anaranjado, pues 0° indica el color rojo y 90° el amarillo (Marcus, 1999).

El C* o *Chroma* por su parte, es el vector de distancia calculado desde el centro del espacio del color hasta el color medido (Socaciu & Diehl, 2009), e indica la intensidad del color (Qin *et al.*, 2005). Estadísticamente existe diferencia en este parámetro entre la zanahoria y el jugo, para el cual se obtiene un menor valor, lo que indica que el proceso tiene un efecto en la disminución de la intensidad del color anaranjado del producto, lo que se puede deber a la oxidación durante el procesamiento (Rodríguez-Amaya, 2001).

Finalmente, el parámetro *L*,* que indica la intensidad luminosa del color (Socaciu & Diehl, 2009), se vio poco afectado por la transformación de zanahoria en jugo. Es importante destacar que se decidió utilizar la escala CIELCh debido a que con esta, las lecturas instrumentales coinciden más cercanamente con la percepción humana del color (Socaciu & Diehl, 2009).

Sólidos insolubles en suspensión y turbidez

La turbidez en los jugos de frutas puede ser un atributo positivo o negativo según las expectativas del consumidor (Sin *et al.*, 2006). En el caso del jugo de zanahoria, el proceso convencional de producción mediante un prensado mecánico de la pulpa, resulta en un jugo levemente turbio (Demir *et al.*, 2004) y de esta forma el consumidor lo identifica.

A partir del contenido de sólidos insolubles en suspensión (Cuadro VIII), se evidencia que el jugo obtenido es pulposo y por lo tanto también es turbio, debido a que la turbidez provee una medida directa de la concentración de partículas polidispersas en una solución como consecuencia de la medición de sus propiedades de dispersión de la luz (Vaillant *et al.*, 2008).

Rendimiento de extracción de jugo

Con respecto al rendimiento del proceso de extracción de jugo, el resultado obtenido se muestra en el Cuadro IX. Este fue obtenido empleando una masa inicial de zanahoria pelada de aproximadamente 900 kg.

Cuadro IX. Porcentaje de rendimiento del proceso de extracción de jugo de zanahoria fabricado a nivel industrial mediante el proceso convencional*.

Parámetro evaluado	Valor obtenido
Rendimiento de extracción de jugo (% m/m)	51±5

*Dato reportado como promedio ± intervalo de confianza (n = 3) con un nivel de confianza del 95 %.

De acuerdo con lo obtenido experimentalmente, Di Giacomo & Taglieri (2009) mencionan que utilizando métodos tradicionales de producción de jugo de zanahoria, a partir de un kilogramo de zanahorias pre-tratadas adecuadamente se obtiene de 0,50 a 0,55 kilogramos de jugo, dependiendo del proceso de producción y de la variedad de zanahoria empleada. Es debido a los bajos rendimientos asociados con la producción de este tipo de jugo, que la

industria está utilizando nuevas tecnologías para la extracción, entre ellas, la aplicación de tratamientos enzimáticos (Sharma *et al.*, 2010).

Se cuenta con datos que indican que durante el año 2010 y los primeros 10 meses del 2011, en la industria evaluada se procesó aproximadamente 387.967 kg de zanahoria en jugo, lo cual, con base en el rendimiento de extracción promedio observado, produjo 197.863 kg de jugo de zanahoria y 190.104 kg de residuos (Alfaro, 2011).

5.2 SELECCIÓN DEL PREPARADO ENZIMÁTICO MÁS ADECUADO PARA MAXIMIZAR EL RENDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE JUGO DE ZANAHORIA A NIVEL DE LABORATORIO

Las enzimas pécticas comerciales y otras enzimas, forman hoy en día una parte integral de la tecnología de fabricación de jugos. Estas son utilizadas para facilitar la extracción, la clarificación y la modificación de jugos de muchas frutas, así como también de vegetales (Lozano, 2006).

Con el fin de seleccionar un preparado enzimático adecuado para llevar a cabo la optimización de las condiciones del tratamiento de pulpa de zanahoria (tiempo de incubación y concentración de preparado enzimático) previo a la extracción de jugo, se comparó el rendimiento, el pH, el contenido de sólidos solubles y sólidos insolubles en suspensión, la turbidez, el color, el contenido de sólidos totales y de carotenoides totales del jugo, al aplicar tres preparados comerciales en condiciones de pH, temperatura, tiempo y concentración determinadas.

Se compararon además las variables respuesta mencionadas, al aplicar el proceso de extracción convencional, que refiere a la fabricación del jugo por un proceso de molienda y prensado mecánico de la zanahoria, sin la aplicación de un tratamiento enzimático, el cual representa lo llevado a cabo actualmente en la industria. También al aplicar la temperatura de tratamiento a T1 °C sin la adición de un preparado enzimático, a partir de la realización de un tratamiento control.

En el Cuadro X se observan los resultados obtenidos para los diferentes parámetros evaluados al aplicar los distintos tratamientos a 300 g de pulpa de zanahoria. Se utilizó una concentración fija de los tres preparados enzimáticos, sin embargo, se debe tener en cuenta

que aunque no se realizó en el presente estudio, la determinación de la actividad enzimática es importante para seleccionar la dosis de enzimas en estudios que comparan diferentes preparados (Buchert *et al.*, 2005).

Cuadro X. Evaluación del rendimiento de extracción de jugo de zanahoria a nivel de laboratorio y algunas características físicas y químicas de este, en función de la aplicación o no de un proceso enzimático empleando distintos preparados (pH1, concentración de enzimas 200 ppm, tiempo de incubación 60 min y temperatura de incubación T1 °C)†.

Parámetro evaluado		Tratamiento				
		Proceso convencional	Proceso control (sin enzima)	Proceso enzimático		
				P1	P2	P3
Rendimiento de extracción de jugo (% m/m)		63,6±0,7^{b}	65±2^{b}	70±1^{a‡}	70,4±0,6^{a‡}	72±2^{a‡}
pH		4,71±0,02^{ab}	4,80±0,04^{a}	4,63±0,06^{b‡}	4,58±0,07^{b‡}	4,59±0,08^{b‡}
Sólidos solubles (°Brix)		7,8±0,3^{b}	8,6±0,2^{a}	8,9±0,2^{a‡}	9,00±0,00^{a‡}	8,97±0,05^{a‡}
Sólidos insolubles en suspensión (% m/m)		2,2±0,1^{a}	1,6±0,1^{c}	1,91±0,08^{b‡}	2,1±0,1^{ab‡}	1,27±0,02^{d‡}
Turbidez (NTU)		9155±1417^{a}	5574±191^{b}	5824±1028^{b}	6221±1012^{b}	2578±228^{c‡}
Color	*L**	53,1±0,6^{a}	50,1±0,7^{b}	48,9±0,9^{b}	48,9±1,0^{b}	42±1^{c‡}
	*C**	71,9±1,0^{a}	68,2±0,5^{b}	69±1^{b}	69,3±0,7^{b}	57,6±0,9^{c‡}
	H°	56,2±0,2^{a}	56,0±0,2^{a}	54,2±0,4^{bc‡}	53,9±0,2^{c‡}	54,8±0,4^{b‡}
Sólidos totales (% m/m)**		8,8±0,3	8,9±0,5	9,3±0,2	9,4±0,3	9,2±0,2
Carotenoides totales (µg β-caroteno /g muestra)	BH	80±6^{a}	48±2^{c}	61±8^{b‡}	65±5^{b‡}	32±4^{d‡}
	BS	902±69^{a}	539±13^{c}	655±93^{bc}	690±69^{b‡}	349±35^{d‡}

†Datos reportados como promedio ± intervalo de confianza (n = 3) con un nivel de confianza del 95 %. Dentro de una misma fila, promedios con diferente letra son significativamente distintos (Tukey-Kramer HSD, $p < 0,05$). ‡Dentro de una misma fila promedios de tratamientos enzimáticos son significativamente distintos al tratamiento control (Dunnett, $p<0,05$). BH: Base húmeda. BS: Base seca. **Análisis realizados por el Laboratorio de Química del CITA.

Rendimiento de extracción de jugo

El rendimiento de extracción de jugo de zanahoria aumentó significativamente al aplicar un tratamiento enzimático, entre 5 y 7 % (m/m) con respecto al proceso control, y no se observó diferencias significativas entre los distintos preparados. En cuanto a este parámetro, aplicar

una temperatura de T1 °C durante 1 hora, no causó diferencia significativa entre el valor obtenido para el proceso control y el convencional.

La aplicación de un tratamiento enzimático, es un proceso moderno bien conocido para obtener mayor cantidad de jugo a partir de frutas y vegetales (Liao *et al.*, 2007). La pared celular de la zanahoria posee una lamela media y una pared primaria; la lamela media actúa como una sustancia intracelular para la unión de las células y está compuesta principalmente de pectina, mientras que la pared primaria es una red fuerte compuesta de paquetes de celulosa cristalina con lignina incrustada, en la que cadenas de glucanos están dispuestas al azar y la celulosa es amorfa (Qin *et al.*, 2005).

Las enzimas pectinolíticas hidrolizan la pectina de la lamela media de la pared celular, ocasionando la separación de las células. La pared primaria, debido a su composición, es probablemente más susceptible a la degradación por enzimas celulolíticas; la degradación progresiva de las fibras de celulosa conlleva a la pérdida de la fortaleza de la pared y esta se rompe en fragmentos, facilitando la extracción de jugo (Qin *et al.*, 2005).

En un estudio realizado por Liao *et al.* (2007), se determinó que al aplicar un tratamiento enzimático con 100 ppm de Pectinex Smash XXL, a pH 4,5-5,0 y temperatura 40-45 °C durante 80 min en pulpa de zanahoria, el rendimiento de extracción de jugo aumentó significativamente en un 20 % (m/m) con respecto a la muestra control. Por otra parte, Demir *et al.* (2004) establecieron que al aplicar un tratamiento utilizando 0,1 % de Pectinex® Ultra SP-L, a pH 4,5 y temperatura 35 °C durante 60 min, el rendimiento incrementó en aproximadamente 7 % (m/m). Sun *et al.* (2006) por su parte, confirmaron que cuando se realiza el tratamiento enzimático de pulpa de zanahoria, el rendimiento de extracción se ve significativamente aumentado en comparación con la muestra control.

pH y sólidos solubles (°Brix)

El pH del jugo de zanahoria disminuyó significativamente al aplicar un proceso enzimático, entre 0,17 y 0,22 unidades con respecto al proceso control, y no se observó diferencia significativa entre los distintos preparados. En cuanto a este parámetro, aplicar una temperatura de T1 °C durante 1 hora, no causó diferencia significativa entre el valor obtenido para el proceso control y el convencional.

La disminución en el pH durante la maceración enzimática es el resultado de la formación de ácido galacturónico después de la degradación de las cadenas de pectinas (Demir *et al.*, 2007), ya que durante el proceso de tratamiento con enzimas pectinolíticas, la protopectina y la pectina son degradadas en ácido galacturónico, incrementando así el ácido urónico, el contenido de metanol y la acidez total del producto (Demir *et al.*, 2004).

En el estudio realizado por Demir *et al.* (2004), en jugo de zanahoria se obtuvo un resultado similar, pues se determinó que al aplicar un tratamiento enzimático con 0,1 % de Pectinex® Ultra SP-L, a pH 4,5 y temperatura 35 °C durante 60 min, el pH disminuye de 4,61±0,04 a 4,25±0,02.

Por otra parte, el contenido de sólidos solubles aumentó significativamente al aplicar un proceso enzimático, entre 0,3 y 0,4 °Brix con respecto al proceso control, y no se observó diferencias significativas entre los distintos preparados. Aplicar una temperatura de T1 °C durante 1 hora, causó un aumento significativo en el contenido de °Brix para el proceso control con respecto al convencional.

Según lo anterior, es importante considerar que en el caso de las muestras obtenidas a partir de los procesos enzimáticos, el rendimiento de extracción fue significativamente mayor al obtenido para el proceso control, lo cual sugiere que el tratamiento enzimático ocasiona tanto la salida de jugo como la solubilización de azúcares y ácidos, aunque el efecto como tal no se refleje en gran magnitud al considerar únicamente el valor de °Brix.

Durante la licuefacción total de jugos de frutas y vegetales, al ser degradada la pectina de la lamela media y de la pared celular por enzimas exógenas, materiales solubles como ácidos y azúcares neutros (arabinosa, galactosa, rhamnosa y xilosa) que están unidos a las sustancias pécticas, son liberados y se tornan solubles (Demir *et al.*, 2004; Demir *et al.*, 2007). Además de la despolimerización de pectinas alta y bajamente esterificadas, durante el tratamiento enzimático también ocurre hidrólisis parcial de celulosa (por actividad adicional de algunos preparados enzimáticos, ver Cuadro II), lo cual también ayuda a incrementar el contenido de materia seca soluble (Demir *et al.*, 2007).

Con respecto a esto, Sun *et al.* (2006) determinaron que cuando se aplica un tratamiento enzimático en pulpa de zanahoria, aumenta significativamente el contenido de sólidos solubles (°Brix) en comparación con la muestra control. Asimismo, Liao *et al.* (2007) y Demir

et al. (2004) encontraron, al realizar un tratamiento enzimático en pulpa de zanahoria en condiciones previamente mencionadas, que el contenido de sólidos solubles aumentó aproximadamente en un 1 %.

Con respecto al incremento en los °Brix obtenido al aplicar la temperatura de T1 °C durante 1 hora, es posible que esta, al favorecer el ablandamiento de las células de la zanahoria, propicie también la liberación de azúcares y ácidos.

Sólidos insolubles en suspensión y turbidez

El contenido de sólidos insolubles en suspensión se vio significativamente afectado al aplicar un tratamiento enzimático con respecto al proceso control. Este parámetro fue mayor en los jugos obtenidos al utilizar los preparados enzimáticos P1 y P2, entre los cuales no se observaron diferencias significativas, y menor al emplear P3, para el cual también se observó una disminución en la turbidez. Los datos presentados confirman que el aspecto del jugo producido al utilizar este último preparado enzimático fue muy diferente a los demás evaluados, dado que la apariencia del jugo presentó características de un producto clarificado; lo cual no se consideró aceptable según los requerimientos de la industria.

Por otra parte, aplicar una temperatura de T1 °C durante 1 hora causó disminución significativa importante de 0,6 % (m/m) en el contenido de sólidos insolubles en suspensión y de 3581 NTU en la turbidez del jugo obtenido con el proceso control, en comparación con el convencional.

La turbidez de una dispersión depende mayormente de la forma, el tamaño y la composición mineral de las partículas, así como también del índice de refracción relativo y hasta cierto punto del color de la fase líquida. Sin embargo, se puede asumir que el color de la fase líquida, la composición mineral y el índice de refracción relativo de los sólidos en el jugo son muy similares para una misma especie de fruta; por lo que los valores de turbidez pueden ser utilizados para discriminar entre jugos de la misma especie de frutas pero con diferente concentración, forma y tamaño de las partículas en suspensión (Vaillant *et al.*, 2008), lo que también aplica para jugos de vegetales.

En un jugo, los sólidos suspendidos corresponden principalmente a polisacáridos (pectina, celulosa, hemicelulosa, lignina y almidón), proteínas, taninos, metales y microorganismos (Sin *et al.*, 2006). En el caso del jugo de zanahoria obtenido del prensado directamente

después de la trituración, el cual es rico en partículas insolubles, estos se componen principalmente de sustancias pécticas (Kashyap *et al.*, 2001).

Durante el tratamiento enzimático, al ser degradadas la protopectina y la pectina, se espera que la turbidez decrezca razonablemente (Sun *et al.*, 2006); esto debido a que la disminución en el tamaño de las partículas va a permitir que una mayor cantidad de luz pase a través del jugo (Liao *et al.*, 2007).

Diversas tendencias se reportan en la literatura con respecto al efecto de los tratamientos enzimáticos en el contenido de sólidos insolubles en suspensión y la turbidez de jugo de zanahoria, por lo que podría pensarse que los efectos son dependientes de los preparados enzimáticos que se utilizan.

Liao *et al.* (2007) determinaron que al realizar un tratamiento enzimático en las condiciones previamente mencionadas, la turbidez del jugo de zanahoria no se vio significativamente afectada; mientras que Reiter *et al.* (2003) observaron que al realizar diversos tratamientos enzimáticos, la turbidez inicial de los jugos tratados enzimáticamente siempre fue mayor a la del jugo control. Por otra parte, Sun *et al.* (2006) determinaron, empleando diferentes preparados enzimáticos, que en algunos casos la turbidez del jugo fue igual al del control, mientras que en otros esta se redujo significativamente.

Con respecto a lo observado al aplicar una temperatura de T1 °C durante 1 hora, los resultados obtenidos concuerdan con lo estipulado por Reiter *et al.* (2003), quienes determinaron que el contenido de las partículas insolubles fue reducido por el mezclado y el calentamiento de la pulpa, siendo menor la turbidez obtenida para el proceso control en comparación con aquella muestra obtenida directamente sin calentar la pulpa.

Vaillant *et al.* (2008), estudiaron la relación entre la turbidez y el contenido de sólidos insolubles en suspensión en jugo de banaño, piña y mora, tratados y no tratados enzimáticamente, y determinaron que la turbidez parece ser un buen indicador del contenido de sólidos insolubles en suspensión y que puede ser incluso, una medición más precisa.

Color

En general, el color de los jugos de zanahoria elaborados a partir de los tratamientos enzimáticos, se vio significativamente afectado con respecto al del proceso control. El

parámetro de color *Hue* (*H*°) disminuyó en los jugos en que se aplicó un preparado enzimático; según Qin *et al.* (2005), el valor H° indica la proporción de color amarillo a rojo y cuando es más bajo, la proporción del color rojo es más alta y el color del jugo de zanahoria es mejor. Por otra parte, la luminosidad (*L**) y el *Chroma* (*C**) disminuyeron únicamente al utilizar el preparado P3, lo cual indica que el color del jugo obtenido utilizando dicho preparado posee un color más opaco y menos vivaz.

Aplicar una temperatura de T1 °C durante 1 hora, afectó negativamente el color del jugo, pues el fabricado mediante el proceso control, presentó un color más opaco y menos vivaz en comparación con el obtenido para el proceso convencional; sin embargo, la tonalidad no se vio afectada.

Está establecido que el color es el principal parámetro de calidad del jugo de zanahoria (Qin *et al.*, 2005). En el estudio realizado por Liao *et al.* (2007) la luminosidad y la vivacidad del color (*L** y *C**) aumentaron con el tratamiento enzimático, mientras que, un aumento en *a** y una disminución en *b**, les permitió observar que se obtuvo un color más rojo y menos amarillo, lo cual concuerda con lo observado experimentalmente a partir del valor *H*°. Por otra parte, Demir *et al.* (2004) encontraron en su estudio, que la intensidad del color no se afectó con el tratamiento enzimático, lo cual ocurrió en este experimento para dos de los tres preparados enzimáticos evaluados.

La baja calidad del color de los jugos tratados enzimáticamente con respecto al proceso convencional, reflejada a partir de los parámetros *L** y *C**, podría ser el resultado de la isomerización y la oxidación de los carotenoides durante el procesamiento (Rodríguez-Amaya, 2001). Esto puesto que una disminución en la vivacidad del color está cercanamente relacionada con la reducción en el contenido de carotenoides en el jugo de zanahoria, así como también podría resultar de la decoloración enzimática (Liao *et al.*, 2007). En este punto, es importante destacar que en el presente estudio las zanahorias no fueron escaldadas previamente al tratamiento enzimático, mientras sí lo fueron en los estudios contrastados.

Sólidos totales

El contenido de sólidos totales no se vio significativamente afectado por la aplicación de los distintos tratamientos. Sin embargo, la potencia de la prueba fue baja (48,5 %) y por lo tanto no se puede ser concluyente, al ser insuficiente el número de repeticiones realizadas.

Se ha establecido que la aplicación de un tratamiento enzimático tiene un efecto positivo para alcanzar un alto nivel de materia seca en el jugo de zanahoria (Liao *et al.*, 2007). Demir *et al.* (2004) determinaron que el contenido de cenizas en el jugo aumenta al aplicar un tratamiento enzimático, lo cual ocurre debido al rompimiento de los tejidos vegetales después de la licuefacción.

Carotenoides totales

El contenido de carotenoides totales del jugo, en base húmeda, aumentó significativamente al aplicar un proceso enzimático, entre 13 y 17 μg β-caroteno /g muestra con respecto al proceso control cuando se utilizan los preparados enzimáticos P1 y P2, entre los cuales no se encontraron diferencias significativas; mientras que disminuyó en 16 μg β-caroteno/g muestra al emplear P3.

En cuanto a este parámetro, aplicar una temperatura de T1 °C durante 1 hora, causó una reducción importante en el contenido de carotenoides totales, pues se observó una disminución de 32 μg β-caroteno/g muestra para el proceso control con respecto al convencional.

Lo anteriormente mencionado, evidencia que a pesar de la disminución en el contenido de carotenoides totales que ocurre al aplicar las condiciones del tratamiento enzimático (temperatura de T1 °C durante 1 hora), los preparados P1 y P2 propiciaron la liberación de carotenoides. En base seca se observó una tendencia similar.

El contenido de carotenoides en el jugo de zanahoria es un muy importante para su calidad (Qin *et al.*, 2005). Se ha establecido que el tratamiento con enzimas pectinolíticas, no sólo debe aumentar el rendimiento de extracción, sino también el contenido de carotenos en el jugo de zanahoria (Liao *et al.*, 2007), ya que estas al hidrolizar la pared celular de los tejidos vegetales, favorecen la liberación de estos compuestos (Sun *et al.*, 2007).

Con respecto a esto, en estudios anteriores se han encontrado distintas tendencias, sin embargo, Rodríguez-Amaya & Kimura (2004) explican que el porcentaje de retención o la pérdida de carotenoides durante el procesamiento y el almacenamiento de alimentos, es a menudo inconsistente y difícil de interpretar por varias razones, como la poca o nula descripción de las condiciones del estudio y fallas en las determinaciones analíticas.

Liao *et al.* (2007) determinaron que el contenido de carotenoides totales aumentó significativamente después de realizar el tratamiento enzimático utilizando el preparado enzimático Pectinex Smash XXL (en condiciones previamente mencionadas). Sun *et al.* (2006), encontraron un resultado similar utilizando dicho preparado y Pectinex® Ultra SP-L (45 °C, pH 4,8); sin embargo, determinaron que utilizando otros preparados enzimáticos, el contenido de β-caroteno disminuye en comparación con la muestra control, lo que atribuyen al aumento en el rendimiento de extracción de jugo.

Del mismo modo, Demir *et al.* (2004) determinaron que al realizar un tratamiento enzimático utilizando Pectinex® Ultra SP-L (en condiciones previamente mencionadas), se obtiene un efecto negativo en el contenido de β-caroteno, lo cual se piensa que es un efecto colateral como resultado del aumento en el rendimiento y en los sólidos solubles de la muestra tratada enzimáticamente. Es importante destacar, que en los tres estudios mencionados, se realizó un tratamiento térmico a la zanahoria o a la pulpa, previo a la realización del tratamiento enzimático con el fin de inactivar las enzimas endógenas (Demir *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2006; Liao *et al.*, 2007).

En el caso del presente estudio, se evidenció que la aplicación de una temperatura de T1 °C durante 1 hora causó una gran disminución en el contenido de carotenoides totales en el jugo, lo que se puede atribuir a una degradación enzimática (por efecto de las enzimas endógenas) y no enzimática, que son las mayores causas de destrucción de estos compuestos altamente insaturados durante el procesamiento (Rodríguez-Amaya & Kimura, 2004).

Antes de iniciar el procesamiento, los carotenoides se encuentran protegidos en los tejidos de las plantas, luego del cortado y la molienda de las frutas y los vegetales, su exposición al oxígeno aumenta y se favorece la interacción de estos con las enzimas que catalizan su oxidación (Rodríguez-Amaya & Kimura, 2004). Además, al aplicar un tratamiento térmico, mejora la disponibilidad de los carotenoides mediante el rompimiento de los complejos cristalinos de estos, formados con proteínas (Sharma *et al.*, 2009).

La magnitud de las reacciones de oxidación depende del tipo y el estado físico de los carotenoides presentes, del contenido de lípidos insaturados, el oxígeno disponible, la exposición a la luz, la presencia de enzimas, metales, prooxidantes y antioxidantes; y la severidad del tratamiento, que refiere a la destrucción de la estructura que protege estos

compuestos, el aumento del área de contacto, la duración y la temperatura del tratamiento térmico (Rodríguez-Amaya, 2001; Rodríguez-Amaya & Kimura, 2004).

La actividad enzimática de la lipooxigenasa (LPO) en particular, acelera la degradación oxidativa por medio de un mecanismo indirecto donde la enzima primero cataliza la oxidación de ácidos grasos insaturados y poliinsaturados para producir peróxidos y estos luego reaccionan con los carotenoides (von Elbe & Schwartz, 1996).

Es importante destacar que, a pesar de que el escaldado puede provocar alguna pérdida de carotenoides, la inactivación de las enzimas oxidativas mediante este tratamiento previene posteriores y mayores pérdidas durante las etapas de procesamiento previas al tratamiento térmico (Rodríguez-Amaya & Kimura, 2004). En el presente estudio, esta operación no se realizó y probablemente se favoreció la degradación oxidativa de los carotenoides por la acción de las enzimas endógenas.

Costo de los preparados enzimáticos

Para la selección del preparado enzimático más adecuado con el fin de maximizar el rendimiento de extracción de jugo de zanahoria, además de considerar el rendimiento y las características físico-químicas del jugo obtenido al utilizar los distintos preparados enzimáticos, se tomó en cuenta su precio como un criterio de decisión importante, el cual se muestra seguidamente en el Cuadro XI.

Cuadro XI. Precio de los diferentes preparados enzimáticos utilizados.

Preparado enzimático	Costo por litro*
P1	$28,25
P2	$41,10
P3	$37,67

* Se maneja presentaciones de 25 L y se aplica una sanción de $600 a pedidos por un monto menor a $6000. Precios no incluyen el impuesto de ventas.

En síntesis, no se encontró diferencia significativa entre el rendimiento de extracción de jugo de zanahoria para los tratamientos donde se aplicaron los distintos preparados enzimáticos. Sin embargo, con respecto a las características físico-químicas del jugo estudiadas, se determinó que algunas de estas, como el contenido de sólidos insolubles en suspensión, la turbidez, el color y el contenido de carotenoides totales, notablemente se deterioraron cuando se empleó P3, por lo que dicho preparado enzimático fue descartado.

Entre los preparados enzimáticos P1 y P2 no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los parámetros evaluados, por consiguiente, para realizar las siguientes etapas del proyecto se seleccionó el preparado que posee el menor precio, que correspondió a P1.

5.3 OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DEL TRATAMIENTO ENZIMÁTICO PARA LA EXTRACCIÓN DE JUGO DE ZANAHORIA A NIVEL DE LABORATORIO

El tratamiento enzimático para la hidrólisis de sustancias pécticas está influenciado por varios factores, entre ellos, el preparado enzimático, el tiempo de incubación, la temperatura de hidrólisis y la concentración de enzimas (Sun *et al.*, 2006; Abdullah *et al.*, 2007).

Es por esto, que una vez seleccionado el preparado enzimático P1 como el más adecuado para la extracción de jugo de zanahoria, se optimizó mediante la aplicación de la metodología de superficie de respuesta empleando un diseño central compuesto rotable, los parámetros de proceso: tiempo de incubación y concentración de preparado enzimático. Estas condiciones de tratamiento enzimático fueron optimizadas en función del rendimiento de extracción de jugo, el contenido de sólidos insolubles en suspensión y la turbidez, los cuales son parámetros importantes de acuerdo a los requerimientos de la industria.

Se evaluó además otras características físicas y químicas del jugo, como el pH, el contenido de sólidos solubles, de sólidos totales, de carotenoides totales y el color, sin embargo, estas no fueron determinantes para la optimización. El rango de respuesta para los diferentes parámetros evaluados bajo las diferentes condiciones de tratamiento enzimático según el espacio experimental definido, se presenta en el Cuadro XII. Los valores obtenidos para cada punto experimental se pueden observar en los cuadros A XXXVII, A XXXVIII y A XXXIX y A XL.

Cuadro XII. Influencia de la concentración del preparado enzimático P1 y del tiempo de incubación a una temperatura de T1, en el rendimiento de extracción y algunas características físicas y químicas de jugo de zanahoria tratado enzimáticamente a nivel de laboratorio según un diseño central compuesto rotable.

Parámetro evaluado		**Rango de respuesta**
Rendimiento de extracción de jugo (% m/m)		67,3 – 76,5
pH		4,36 – 4,82
Sólidos solubles (°Brix)		9,5 – 11,0
Sólidos insolubles en suspensión (% m/m)		1,67 – 2,39
Turbidez (NTU)		4557 – 8943
Color	L^*	46,99 – 52,42
	C^*	68,0 – 75,4
	H^o	54,8 – 57,2
Sólidos totales (% m/m)**		9,5 – 11,2
Carotenoides totales (µg β-caroteno/g muestra)	Base húmeda	42 – 68
	Base seca	417 – 710

** Análisis realizados por el Laboratorio de Química del CITA.

Un polinomio de segundo orden de la forma $Y = \beta_0 + \beta_1 * Cn + \beta_{11} * Cn^2 + \beta_2 * t + \beta_{22} * t^2 + \beta_{12} * Cn * t$ fue ajustado a los datos de las diferentes respuestas evaluadas, donde Y representa el valor de cada uno de los diferentes parámetros evaluados como respuesta, β_k los coeficientes de regresión del modelo, Cn y t la concentración de preparado enzimático y el tiempo de incubación respectivamente, como variables codificadas.

Los coeficientes de regresión, el coeficiente de determinación (R^2), la probabilidad de la regresión y la probabilidad de falta de ajuste, se presentan en Cuadro XIII para los modelos generados para el rendimiento de extracción de jugo, el pH y el contenido de sólidos solubles (°Brix). Una síntesis del análisis de varianza de los distintos modelos se puede observar en el Cuadro A XLI.

Cuadro XIII. Efectos y niveles de significancia (p)[a] de la concentración de preparado enzimático y del tiempo de incubación, en el rendimiento de extracción de jugo, el pH y el contenido de sólidos solubles (°Brix) de jugo de zanahoria tratado enzimáticamente a nivel de laboratorio según un diseño central compuesto rotable.

Coeficiente/ indicador	Rendimiento de extracción de jugo (% m/m)	pH	Sólidos solubles (°Brix)
β_0	73,58905****	4,517333****	10,16667****
β_1 *(Cn)*	2,96790***	-0,113684***	0,32261*
β_{11} *(Cn^2)*	-0,83024**	0,019854	-0,04167
β_2 *(t)*	2,06373***	-0,098955***	0,35207*
β_{22} *(t^2)*	-0,63154**	0,012271	0,00000
β_{12} *(Cn*t)*	-0,38553	0,002833	0,20833
R^2 (%)	94,98	91,63	80,45
R^2 ajustado (%)	91,64	89,54	75,56
Probabilidad de la regresión	< 0,001	< 0,0001	0,001
Probabilidad de falta de ajuste	0,064	0,113	0,757

[a]Niveles de significancia: ****p < 0,001; ***p < 0,01; **p < 0,05; *p < 0,1.

Rendimiento de extracción de jugo

Se observó una diferencia de 9,2 % (m/m) en el rendimiento de extracción de jugo entre los diferentes puntos experimentales. El coeficiente de determinación (R^2) fue de 94,98 % para el modelo de regresión que predice esta variable, la falta de ajuste no fue significativa ($F_{cal} < F_{tab}$) y la regresión sí lo fue ($p < 0,001$).

El coeficiente de determinación (R^2) es definido como la razón de la variación explicada con respecto al total de la variación, y es una medida del grado de ajuste del modelo; dicho de otro modo, es la proporción de la variabilidad en la respuesta que es explicada por el análisis de la regresión. Entre más se aproxime el valor de R^2 a la unidad, el modelo empírico se ajusta mejor a los datos reales; por el contrario, entre más pequeño sea este, menos relevancia tienen las variables dependientes en la explicación del comportamiento de la variación en la respuesta (Sin *et al.*, 2006). En el presente estudio, se consideró aceptable un R^2 mayor a 80 %, indicando que el modelo de la regresión explicó bien los cambios observados.

La probabilidad de la regresión, está asociada al valor F de Fischer, que compara la varianza debida a la regresión corregida por el promedio con la varianza del residuo. Esta representa la probabilidad de que ambas varianzas sea iguales, es decir, de que el modelo no explique los datos más que el cálculo del promedio; y se busca que sea pequeña, generalmente menor a 0,05 (Vaillant, 2011).

La probabilidad de falta de ajuste por su parte, está asociada al valor F de Fischer que compara la varianza de la falta de ajuste con la varianza del error experimental. Esta representa la probabilidad de que las dos varianzas sea iguales, es decir, de que la falta de ajuste del modelo sea igual al error experimental; y se busca que sea lo más alta posible (Vaillant, 2011).

Asimismo, para los modelos generados para esta y las demás respuestas evaluadas, al analizar visualmente el diagrama de residuos se observó una distribución al azar, lo cual junto con los parámetros anteriores, es un indicativo de la adecuación del modelo (Vaillant, 2011).

El tiempo y la concentración afectaron significativamente el rendimiento de extracción de jugo en términos lineales y cuadráticos. Los efectos más importantes fueron presentados por ambas variables independientes en términos lineales, ambos positivos, siendo mayor el correspondiente a la concentración. Por el contrario, los efectos de los términos cuadráticos de dichos factores fueron negativos y no fue significativa la interacción entre ellos.

El efecto de las condiciones del tratamiento enzimático en el rendimiento de extracción de jugo se observa gráficamente en la Figura 9, a partir de la cual es evidente que a T1 °C, el rendimiento aumenta con un incremento en la concentración de preparado enzimático, así como también con un aumento en el tiempo de incubación.

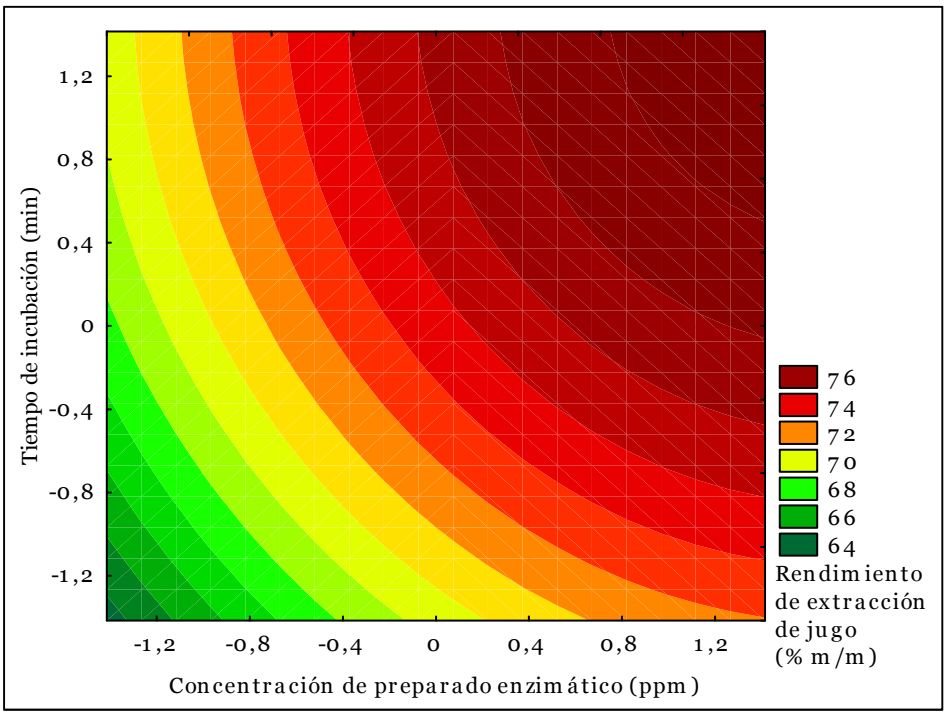

Figura 9. Efecto de la concentración de preparado enzimático y del tiempo de incubación en el rendimiento de extracción (% m/m) de jugo de zanahoria tratado enzimáticamente a nivel de laboratorio a T1 °C.

El modelo generado es consistente con la interpretación de que un incremento en el rendimiento de extracción de jugo, es principalmente el resultado de la acción de las enzimas pectinolíticas sobre los constituyentes de la pared celular de la zanahoria (proto pectina y pectina) y de las enzimas celulolíticas sobre la celulosa, la hemicelulosa y el almidón (Sharma *et al.*, 2005).

Tal como explican los principios de la cinética enzimática, la velocidad de una reacción de este tipo es dependiente de la concentración de enzima, y cuando el sustrato está en exceso, existe una relación proporcional entre la velocidad y la concentración de enzima cuando esta es baja. Posteriormente, a medida que se sigue incrementando la concentración de enzima, la pendiente de la curva de velocidad versus concentración tiende a disminuir, es decir, ocurre que incrementos en igual medida en la concentración de enzima, producen cada vez menores incrementos en la velocidad de la reacción (Badui, 1999).

La actividad principal declarada en el preparado enzimático que se utilizó es pectín liasa, y este presenta también actividad celulasa y poligalacturonasa. La enzima pectín liasa es una endo enzima que ataca los enlaces glicosídicos α-(1,4) entre dos residuos galacturonosil metilados; la poligalacturonasa por su parte, actúa sobre pectinas con un bajo nivel de esterificación e hidroliza los enlaces glicosídicos α-(1,4) entre residuos galacturonosil no metilados (Landbo *et al.*, 2007). Las celulasas son enzimas que degradan la celulosa nativa o derivados de esta en glucosa (Reed & Nagodawithana, 1995).

En contraste con lo encontrado en el presente estudio, al optimizar el proceso en función de la concentración y el tiempo, Sun *et al.* (2006) encontraron un mayor efecto del tiempo en término lineal sobre el rendimiento, seguido por la concentración en término lineal y el tiempo en término cuadrático. De manera similar, Sharma *et al.* (2005), al optimizar en función de la concentración, la proporción de enzimas, el tiempo y la temperatura, determinaron que el tiempo tuvo un efecto lineal positivo y un efecto cuadrático en el rendimiento de extracción; también encontraron que la concentración mostró un efecto cuadrático positivo y un efecto interactivo con todos los factores excepto con la temperatura.

Del mismo modo, en un estudio sobre el efecto del tratamiento enzimático para la extracción de jugo de saúco, se determinó que un aumento en el tiempo y la dosis de enzima significativamente aumentan el rendimiento de extracción de jugo (Landbo *et al.*, 2007).

pH y sólidos solubles (°Brix)

Se observó una diferencia en el pH de 0,48 unidades y de 1,5 °Brix en el contenido de sólidos solubles, entre los distintos puntos experimentales. El coeficiente de determinación del modelo generado fue de 91,63 % y 80,45 % para cada una de estas respuestas según corresponde, la falta de ajuste no fue significativa y la regresión sí lo fue ($p < 0,0001$ para pH; $p = 0,001$ para sólidos solubles).

El tiempo de incubación y la concentración de preparado enzimático afectaron significativamente el pH y el contenido de sólidos solubles en el jugo en términos lineales, no se observó efecto significativo de los términos cuadráticos ni de la interacción entre ambos factores. Tanto en el caso del pH como de los sólidos solubles, ambos factores presentaron un efecto sobre las respuestas similar en magnitud; en el caso del pH este fue negativo, mientras que en el caso de los sólidos solubles se observó un efecto positivo. Esto indica que a medida

que aumentan el tiempo de incubación y la concentración de enzima, aumenta el contenido de sólidos solubles y disminuye el pH del jugo.

Lo anterior es consistente con los resultados esperados, ya que como se ha mencionado, durante el tratamiento enzimático, como consecuencia de la degradación de las cadenas de pectina, se forma ácido galacturónico, aumentando así la acidez del producto (Demir *et al.*, 2004). Asimismo, durante este proceso, materiales solubles además de ácidos, como azúcares neutros y otros componentes derivados de la degradación de polisacáridos, son liberados y se tornan solubles, propiciando un aumento en el contenido de sólidos solubles (Demir *et al.*, 2004; Demir *et al.*, 2007).

Seguidamente, en el Cuadro XIV, se presentan los coeficientes de regresión, el coeficiente de determinación (R^2), la probabilidad de la regresión y la probabilidad de falta de ajuste, para los modelos generados para el contenido de sólidos insolubles en suspensión y la turbidez. Una síntesis del análisis de varianza de ambos modelos se puede observar en el Cuadro A XLII.

Cuadro XIV. Efectos y niveles de significancia (p)[a] de la concentración de preparado enzimático y del tiempo de incubación, en el contenido de sólidos insolubles en suspensión y la turbidez de jugo de zanahoria tratado enzimáticamente a nivel de laboratorio según un diseño central compuesto rotable.

Coeficiente/ indicador	Sólidos insolubles en suspensión (% m/m)	Turbidez (NTU)
β_0	1,856750****	5426,67***
$\beta_1 (Cn)$	-0,037469	-585,38*
$\beta_{11} (Cn^2)$	0,063478	558,96*
$\beta_2 (t)$	-0,231370***	-1542,40***
$\beta_{22} (t^2)$	0,107756**	641,46*
$\beta_{12} (Cn*t)$	0,029156	351,67
R^2 (%)	90,76	93,82
R^2 ajustado (%)	86,81	89,70
Probabilidad de la regresión	< 0,001	< 0,001
Probabilidad de falta de ajuste	0,275	0,372

[a]Niveles de significancia: ****p < 0,001; ***p < 0,01; **p < 0,05; *p < 0,1.

Sólidos insolubles en suspensión y turbidez

Se observó una diferencia de 0,72 % (m/m) en el contenido de sólidos insolubles en suspensión y de 4386 NTU en la turbidez del jugo de zanahoria entre los diferentes puntos experimentales. Como se puede observar en el Cuadro XIV, el coeficiente de determinación (R^2) del modelo fue de 90,79 % y 93,82 % para el contenido de sólidos insolubles en suspensión y la turbidez, según corresponde, la falta de ajuste no fue significativa y la regresión sí lo fue ($p < 0,001$).

El tiempo afectó significativamente el contenido de sólidos insolubles en suspensión en el jugo en términos lineales y cuadráticos; mientras que la concentración no afectó significativamente, sin embargo, se incluyó en el modelo el efecto cuadrático de esta ($p=0,11$). El efecto más importante fue presentado por el tiempo en término lineal, el cual fue negativo, y no fue significativa la interacción ente ambos factores.

Por otra parte, la concentración y el tiempo afectaron significativamente la turbidez del jugo en términos lineales y cuadráticos. El efecto más importante fue presentado por el tiempo en término lineal, el cual fue negativo, y no fue significativa la interacción entre los factores evaluados.

El efecto de las condiciones del tratamiento enzimático sobre el contenido de sólidos insolubles en suspensión del jugo se observa gráficamente en la Figura 10, a partir de la cual, en términos generales, a T1 °C el contenido de sólidos insolubles en suspensión disminuye al aumentar el tiempo de incubación, y se ve poco afectado por la concentración de preparado enzimático.

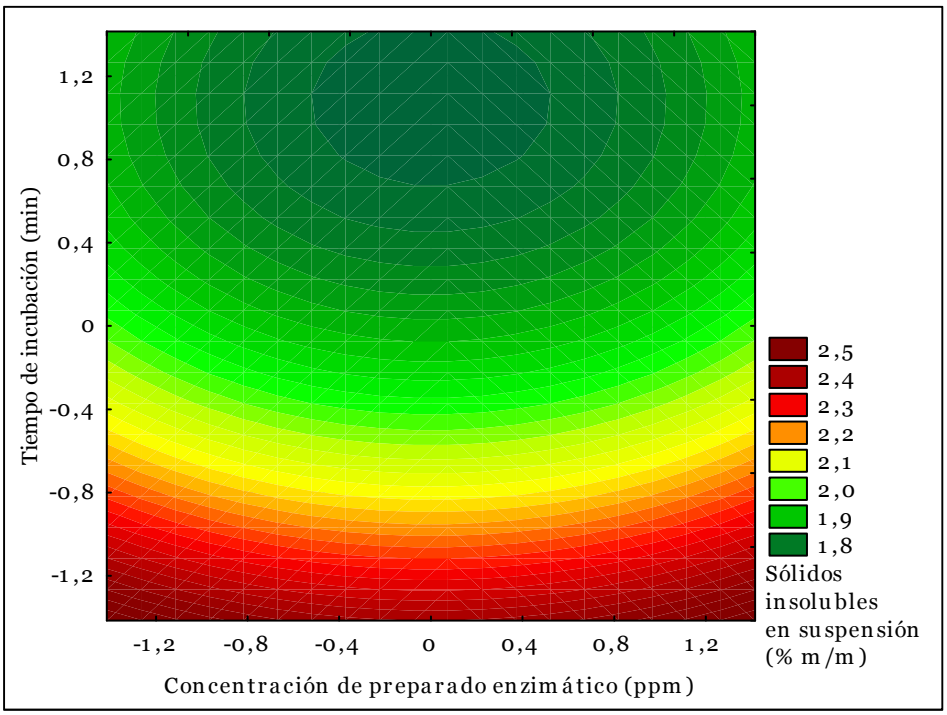

Figura 10. Efecto de la concentración de preparado enzimático y del tiempo de incubación en el contenido de sólidos insolubles en suspensión (% m/m) de jugo de zanahoria tratado enzimáticamente a nivel de laboratorio a T1 °C.

Por otra parte, en la Figura 11 se aprecia el efecto de las condiciones del tratamiento enzimático en la turbidez del jugo, a partir de la cual se observa que al igual que ocurre con el contenido de sólidos insolubles en suspensión, a T1 °C la turbidez del jugo disminuye al aumentar el tiempo de incubación y se ve poco afectada por la concentración de preparado enzimático.

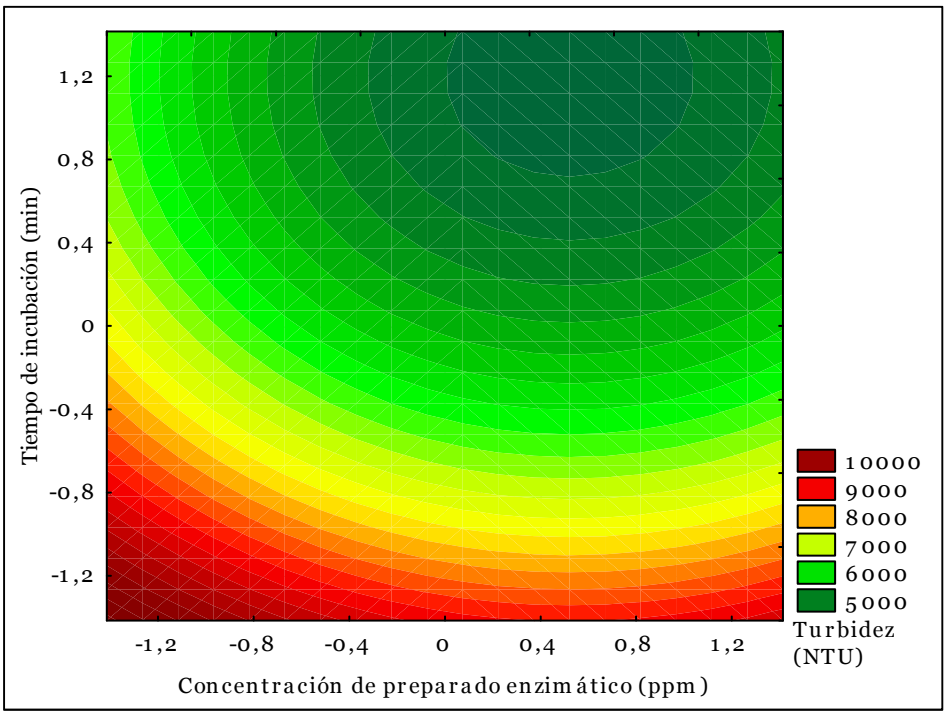

Figura 11. Efecto de la concentración de preparado enzimático y del tiempo de maceración en la turbidez (NTU) de jugo de zanahoria tratado enzimáticamente a nivel de laboratorio a T1 °C.

Como ha sido mencionado, en un jugo, los sólidos suspendidos corresponden principalmente a polisacáridos, como pectina, celulosa, hemicelulosa, lignina y almidón; proteínas, taninos, metales y microorganismos (Sin *et al.*, 2006), y son los polisacáridos los que mayormente causan la turbidez (Abdullah *et al.*, 2007).

Abdullah *et al.* (2007) explican que un aumento en la concentración de enzima y en el tiempo de incubación, puede disminuir la turbidez de un jugo, ya que a medida que el tratamiento enzimático toma lugar, la cantidad de pectina decrece, disminuyendo por lo tanto la turbidez (Abdullah *et al.*, 2007) y asimismo el contenido de sólidos insolubles en suspensión.

En el estudio realizado por Abdullah *et al.* (2007), al optimizar el tratamiento enzimático para la clarificación de jugo de carambola en función del tiempo de incubación, la temperatura y la concentración de enzimas, se encontró que la concentración de enzimas afectó significativamente la turbidez a nivel lineal y cuadrático, mostrando un efecto negativo a nivel

lineal. Asimismo, se encontró una interacción significativa con un efecto positivo entre el tiempo y la concentración.

En jugo de zapote chico (*Achras sapota*), Sin *et al.* (2006) optimizaron el tratamiento enzimático en función de la temperatura, el tiempo y la concentración de enzima, y determinaron que el tiempo y la concentración afectaron significativamente la turbidez de modo lineal y cuadrático. Ambas variables independientes mostraron un efecto negativo en términos lineales, pero mostraron uno positivo en sus términos cuadráticos. La interacción entre el tiempo y la concentración fue significativa y su efecto fue positivo en la turbidez.

Por otra parte, en un estudio sobre el efecto del tratamiento enzimático para la extracción de jugo de saúco, se determinó que un aumento en el tiempo, la temperatura de incubación y la concentración de enzima no produjo efectos significativos en la turbidez del jugo (Landbo *et al.*, 2007).

El jugo de zanahoria es un jugo vegetal turbio que contiene partículas suspendidas (Qin *et al.*, 2005). Sin embargo, en la industria donde se realizó el proyecto, para cumplir con los parámetros de calidad requeridos, se aplica una operación de tamizado posterior al prensado mecánico, con el objetivo de eliminar gran parte de los sólidos insolubles en suspensión. Es por esto, que es importante propiciar la disminución en el contenido de sólidos insolubles en suspensión y la turbidez a través de la aplicación de un tratamiento enzimático en condiciones de proceso optimizadas.

En el Cuadro XV, se presentan los coeficientes de regresión, el coeficiente de determinación (R^2), la probabilidad de la regresión y la probabilidad de falta de ajuste, para los modelos generados para los distintos parámetros de color. Una síntesis del análisis de varianza de ambos modelos se puede observar en los cuadros A XLII y A XLIII.

Cuadro XV. Efectos y niveles de significancia (p)[a] de la concentración de preparado enzimático y del tiempo de incubación, en los parámetros de color de jugo de zanahoria tratado enzimáticamente a nivel de laboratorio según un diseño central compuesto rotable.

Coeficiente/ indicador	Color		
	L*	***C****	***H°***
β_0	49,13444****	70,05593****	56,68963****
$\beta_1 (Cn)$	-0,67571****	-0,78237	0,02709
$\beta_{11} (Cn^2)$	0,45986***	0,73884	-0,32794
$\beta_2 (t)$	-2,02631****	-2,59999**	-0,50009
$\beta_{22} (t^2)$	0,08542†	0,77412	-0,29822
$\beta_{12} (Cn*t)$	0,24278**	1,01972	0,01833
R^2 (%)	96,86	73,80	NA
R^2 ajustado (%)	93,71	70,89	NA
Probabilidad de la regresión	< 0,001	< 0,001	NA
Probabilidad de falta de ajuste	0,008	0,251	NA

[a]Niveles de significancia: ****p < 0,001; ***p < 0,01; **p < 0,05; †p < 0,1.
NA: No aplica (la variable no es afectada por los factores evaluados).

Color

Se observó una diferencia de 5,43 en la luminosidad (*L**) del jugo de zanahoria entre los diferentes puntos experimentales. Como se puede observar en el Cuadro XV, el coeficiente de determinación (R^2) fue de 96,86 % para el modelo de regresión que predice esta variable y la regresión fue significativa (p < 0,001); sin embargo, el modelo presentó falta de ajuste ($F_{cal} > F_{tab}$).

Por otra parte, en el caso del parámetro *Chroma* (*C**), se observó una diferencia de 7,4 entre los diferentes puntos experimentales. El coeficiente de determinación (R^2) fue de 73,80 % para el modelo de regresión que predice esta variable, la falta de ajuste no fue significativa, mientras que la regresión sí lo fue (p < 0,001).

El tiempo presentó un efecto significativo negativo en el *Chroma* en términos lineales. El factor concentración no ejerció un efecto significativo así como tampoco el tiempo en término cuadrático, ni la interacción entre ambos factores. Lo anterior indica que a T1 °C, la vivacidad del color disminuye a medida que aumenta el tiempo de incubación durante el tratamiento enzimático.

Como se ha mencionado anteriormente, un aumento en la vivacidad del color está cercanamente relacionado con el incremento en el contenido de carotenoides en el jugo de zanahoria (Liao *et al.*, 2007), por lo que en el caso del presente estudio la disminución en C^* al aplicar el tratamiento enzimático puede deberse a la disminución que se presentó en el contenido de carotenoides totales.

Finalmente, se determinó que el parámetro *Hue* ($H°$) no se ve afectado significativamente por ninguno de los factores evaluado.

Por último, en el Cuadro XVI, se presentan los coeficientes de regresión, el coeficiente de determinación (R^2), la probabilidad de la regresión y la probabilidad de falta de ajuste, para los modelos generados para el contenido de carotenoides totales y sólidos totales. Una síntesis del análisis de varianza de los modelos se puede observar en el Cuadro A XLIII.

Cuadro XVI. Efectos y niveles de significancia (p)[a] de la concentración de preparado enzimático y del tiempo de incubación, en el contenido de carotenoides totales y sólidos totales de jugo de zanahoria tratado enzimáticamente a nivel de laboratorio según un diseño central compuesto rotable.

Coeficiente/ indicador	**Sólidos totales (% m/m)**	**Carotenoides totales (µg β-caroteno/g muestra) (Base seca)**
β_0	9,971131****	456,3382****
β_1 *(Cn)*	0,253098	-48,2285**
β_{11} *(Cn^2)*	0,080710	33,3490**
β_2 *(t)*	0,261599	-99,1686***
β_{22} *(t^2)*	0,069490	44,6765**
β_{12} *(Cn*t)*	0,152252	35,7635**
R^2 (%)	NA	95,37
R^2 ajustado (%)	NA	90,74
Probabilidad de la regresión	NA	< 0,01
Probabilidad de falta de ajuste	NA	0,134

[a]Niveles de significancia: ****p < 0,001; ***p < 0,01; **p < 0,05; *p < 0,1. NA: No aplica (la variable no es afectada por los factores evaluados).

Carotenoides totales

Se observó una diferencia de 293 µg beta caroteno/g muestra (base seca) en el contenido de carotenoides totales en el jugo entre los diferentes puntos experimentales. Como se puede observar en el Cuadro XVI, el coeficiente de determinación de (R^2) fue de 95,37 % para el modelo de regresión que predice esta variable, la falta de ajuste no fue significativa y la regresión sí lo fue ($p < 0, 01$).

El tiempo y la concentración afectaron significativamente el contenido de carotenoides totales en términos lineales y cuadráticos. El efecto más importante fue presentado por el tiempo en término lineal, el cual fue negativo; el efecto lineal de la concentración también fue negativo, mientras que los efectos cuadráticos de ambas variables positivos. Además, se encontró una interacción significativa con un efecto positivo entre ambos factores.

Lo anterior indica que el contenido de carotenoides totales disminuye tanto al incrementar el tiempo de tratamiento enzimático, como la concentración de enzima. Además, que la acción de la enzima es dependiente del tiempo de incubación durante el tratamiento enzimático. En la Figura 12 se aprecia el efecto de las condiciones del tratamiento enzimático sobre el contenido de carotenoides totales.

Sin importar el método de procesamiento, se ha establecido que la retención de carotenoides decrece con largos tiempos y altas temperaturas (Rodríguez-Amaya & Kimura, 2004); por lo que era esperado que la degradación de estos compuestos fuese significativamente incrementada al aumentar el tiempo de proceso.

Con respecto a la concentración del preparado enzimático, el efecto negativo al incrementar este factor, puede ser explicado debido a que las enzimas, al hidrolizar los componentes de la pared celular de la zanahoria, dejan expuestos los carotenoides naturalmente protegidos en los tejidos de las plantas, favoreciendo así las reacciones de oxidación (Rodríguez-Amaya & Kimura, 2004).

Contrariamente a lo encontrado en el presente estudio, al optimizar el proceso en función de la concentración y el tiempo de tratamiento enzimático, Sun *et al.* (2006) encontraron un efecto positivo en el contenido de β-caroteno del tiempo y la concentración en términos lineales; así como también efectos cuadráticos de ambas variables negativos y una interacción positiva entre los factores.

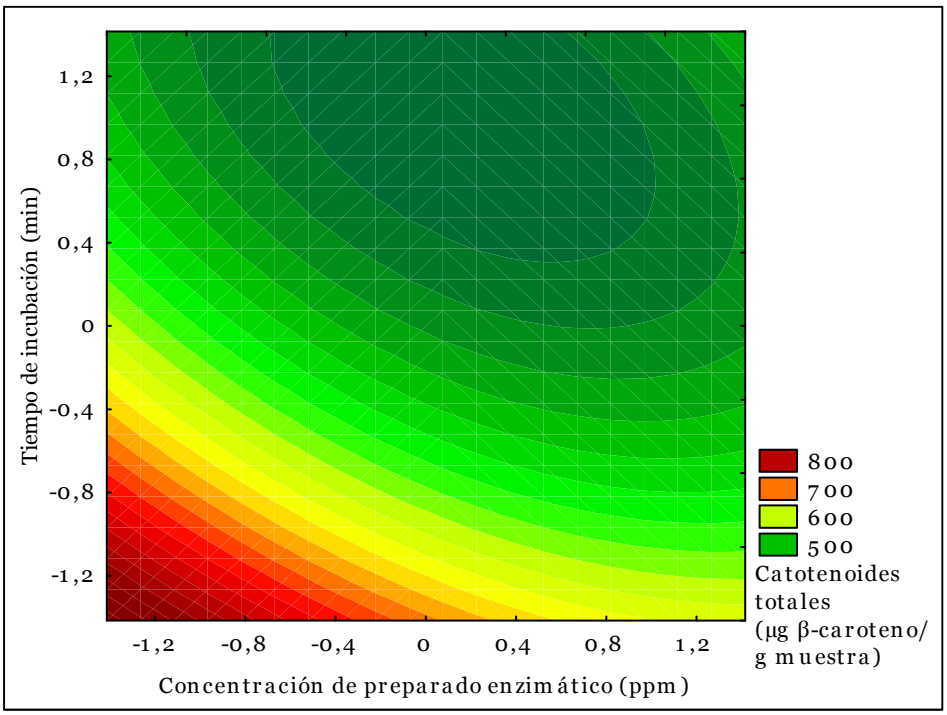

Figura 12. Efecto de la concentración de preparado enzimático y del tiempo de incubación en la el contenido de carotenoides totales de jugo de zanahoria tratado enzimáticamente a nivel de laboratorio a T1 °C.

Sólidos totales

Al igual que en el caso del parámetro *H*°, el contenido de sólidos totales en el jugo de zanahoria no se vio afectado por ninguno de los factores evaluados.

Optimización

Los modelos generados para la predicción del rendimiento de extracción, el contenido de sólidos insolubles en suspensión y la turbidez del jugo de zanahoria, fueron adecuados para la representación de los datos de las respuestas, y pudieron ser subsecuentemente utilizados para propósitos de análisis y predicción (ver los resultados de la verificación en el siguiente apartado).

Por medio de las superficies de respuesta y los gráficos de contorno, la combinación óptima de las condiciones de operación puede ser obtenida gráficamente, con el fin de alcanzar los niveles de los factores deseados para el proceso (Abdullah *et al.*, 2007).

La función de conveniencia (*desirability function*) fue desarrollada para optimizar simultáneamente múltiples respuestas, y se considera el enfoque utilizado más frecuentemente en la práctica. El valor de conveniencia varía entre 0 y 1, y representa la cercanía de una repuesta a su valor ideal. Si la repuesta alcanza el valor ideal, la conveniencia es igual a 1; si alguna de las repuestas no alcanza su valor ideal, la conveniencia para esa respuesta en específico y la conveniencia total serán menores a 1 (Raissi, 2009).

A continuación se muestra en la Figura 13 la representación gráfica de la optimización de los factores de proceso en función de las tres variables de interés: el rendimiento de extracción de jugo, el cual se maximizó; el contenido de sólidos insolubles en suspensión y la turbidez, los cuales fueron minimizados. Esta fue generada utilizando el programa Statistica 7 con base en la función de conveniencia (Statsoft®, USA).

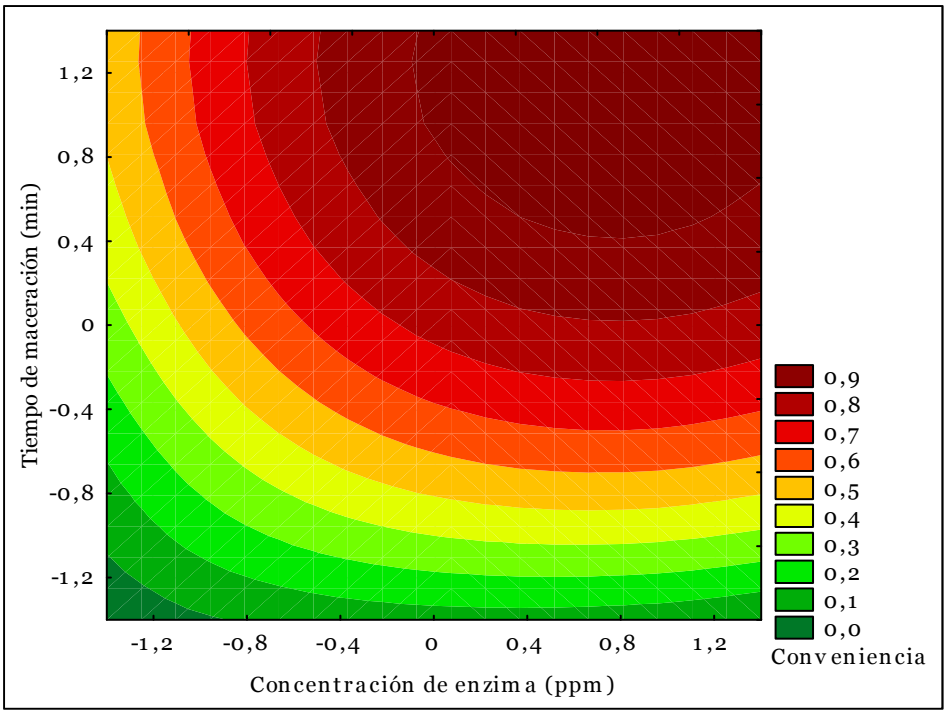

Figura 13. Optimización de las condiciones de tratamiento enzimático para la extracción de jugo de zanahoria a nivel de laboratorio en función del rendimiento de extracción (conveniencia máxima), el contenido de sólidos insolubles en suspensión y la turbidez (conveniencia mínima).

Gráficamente se determinó que el punto donde se alcanza numéricamente el mejor equilibro entre las respuestas evaluadas, corresponde a una concentración de enzima de C3 ppm (0,707 como valor codificado) y a un tiempo de incubación de X3 min (1,414 como valor codificado) (0,96 de conveniencia entre las respuestas deseadas). Sin embargo, lo anterior no se considera industrialmente factible, tanto debido al extenso tiempo de incubación como a la gran concentración de preparado enzimático requeridos.

Al observar nuevamente la Figura 9, correspondiente al efecto de la concentración de preparado enzimático y del tiempo de incubación sobre rendimiento de extracción de jugo, es posible notar que a un tiempo determinado, el rendimiento aumenta en un punto porcentual al incrementarse en intervalos similares la concentración de enzima hasta llegar a la zona correspondiente a 74 % (m/m), sin embargo, más allá de esta zona, es necesario incrementar en mayor medida la concentración para lograr el mismo incremento en un punto porcentual en el rendimiento.

Considerando lo anterior, se decidió trabajar en una región cercana a esta zona, recomendando como condiciones prácticas de operación para maximizar el rendimiento de extracción y minimizar el contenido de sólidos insolubles en suspensión y la turbidez del jugo a nivel industrial, una concentración de C1 ppm (0 como valor codificado) del preparado enzimático P1 y un tiempo de X1 min (0,409 como valor codificado). En las condiciones de proceso seleccionadas, se trabajará en una zona donde la conveniencia entre las respuestas deseadas es mayor a 0,90 (ver Figura 13).

Verificación de resultados

La verificación de resultados es la fase final en el análisis de la adecuación de un modelo de superficie de respuesta para la predicción de las respuestas de interés. En este caso, los modelos fueron verificados llevando a cabo experimentos en las condiciones de operación óptimas recomendadas (Punto A) y en otra combinación de condiciones de operación seleccionadas (Punto B), según se observa en el Cuadro XVII.

Cuadro XVII. Condiciones de proceso óptimas para maximizar el rendimiento de extracción y minimizar el contenido se sólidos insolubles en suspensión y la turbidez en jugo de zanahoria tratado enzimáticamente a nivel de laboratorio, utilizando el preparado enzimático P1 y empleando una temperatura de incubación de T1 °C.

Condiciones de proceso	Punto A (óptimo)		Punto B	
	Valores codificados	Valores naturales	Valores codificados	Valores naturales
Concentración de preparado enzimático (ppm)	0	C1	0,401	C2
Tiempo de incubación (min)	0,409	X1	0,786	X2

Es importante destacar, que para la verificación de resultados se utilizó un lote de materia prima distinto al empleado para generar los modelos durante la optimización. Según Sun *et al.* (2006), un modelo se considera adecuado si los valores predichos son cercanos a los valores experimentales durante las pruebas de validación. Seguidamente en el Cuadro XVIII, se presentan los resultados obtenidos para las pruebas de validación en el punto óptimo (punto A) y posteriormente en el Cuadro XIX, los resultados para el punto B, el cual no fue considerado entre los tratamientos del diseño de superficie de respuesta.

Cuadro XVIII. Respuestas predichas y observadas para las condiciones de proceso óptimas para la extracción de jugo de zanahoria a nivel de laboratorio, utilizando el preparado enzimático P1 y una temperatura de incubación de T1 °C**.

Respuestas		Punto A	
		Valores predichos†	Rango de valores experimentales‡
Rendimiento de extracción de jugo (% m/m)		73,3 – 75,4	76,6 – 78,2
pH		4,47 – 4,53	4,44 – 4,48
Sólidos solubles (°Brix)		9,9 – 10,7	9,6 – 10,0
Sólidos insolubles en suspensión (% m/m)		1,65 – 1,91	1,88 – 2,06
Turbidez (NTU)		3949 – 5858	7089 – 7291
Color	*C**	68,4 – 71,8	72,4 – 73,0
Carotenoides totales (µg β-caroteno/g muestra) (base seca)***		368 - 478	767 - 793

†Intervalo de confianza calculado por el modelo con un nivel de 95 % de confianza. ‡Intervalo calculado como promedio ± intervalo de confianza (n = 3) con un nivel de confianza del 95 %. **Concentración de preparado enzimático C1 ppm, tiempo de incubación X1 min. ***Análisis de humedad realizados por el Laboratorio de Química del CITA.

Cuadro XIX. Respuestas predichas y observadas para una combinación de condiciones de proceso seleccionadas para la extracción de jugo de zanahoria a nivel de laboratorio, utilizando el preparado enzimático P1 y una temperatura de incubación de T1 °C**.

Respuestas		Punto B	
		Valores predichos†	Rango de valores experimentales‡
Rendimiento de extracción de jugo (% m/m)		74,1 – 77,6	78,0 – 79,0
pH		4,36 – 4,47	4,368 – 4,370
Sólidos solubles (°Brix)		9,93 – 11,1	9,9 – 10,3
Sólidos insolubles en suspensión (% m/m)		1,56 – 1,94	1,91 – 2,03
Turbidez (NTU)		2870 – 6062	6558 – 7034
Color	*C**	66,9 – 71,3	71,8 – 72,8
Carotenoides totales (µg β-caroteno/g muestra) (base seca)****		301 – 506	754 – 758

†Intervalo de confianza calculado por el modelo con un nivel de 95 % de confianza. ‡Intervalo calculado como promedio ± intervalo de confianza (n =3) con un nivel de confianza del 95 %. **Concentración de preparado enzimático C2 ppm, tiempo de incubación X2 min. ***Análisis de humedad realizados por el Laboratorio de Química del CITA.

Con base en lo mostrado en los cuadros XVIII y XIX, en ambos puntos de verificación se observó que los resultados experimentales para las variables respuesta pH, contenido de sólidos solubles y sólidos insolubles en suspensión, se encontraron dentro de los intervalos de los valores predichos por los modelos generados. Sin embargo, se observó desviación para los valores de rendimiento de extracción, turbidez, *Chroma* y contenido de carotenoides totales.

Tomando en cuenta que a raíz de pruebas realizadas a lo largo del proyecto, la variabilidad en la composición de la zanahoria fresca determinada en 6 lotes independientes cosechados en distintas épocas en el año 2011 fue alta (10 % para el contenido de carotenoides totales expresado en base seca, 20 % en el contenido de sólidos totales y entre 1 y 4 % para los distintos parámetros de color, entre otros), las variaciones mostradas en los cuadros XVIII y XIX son esperadas, al no haber utilizado para la validación el mismo lote empleado para la generación del modelo. Los parámetros donde se observó una mayor desviación fueron la turbidez y el contenido de carotenoides totales; en el caso del rendimiento y el *Chroma*, los intervalos de valores obtenidos fueron cercanos a los rangos de valores predichos por el modelo para ambos puntos.

Se obtuvo experimentalmente a escala de laboratorio para el punto A de verificación de resultados, el cual corresponde a las condiciones de operación recomendadas para el tratamiento enzimático de pulpa de zanahoria (C1 ppm, X1 min), un rendimiento de

extracción de jugo de 77, 4±0,8 % (m/m), un contenido de sólidos insolubles en suspensión de 1,97±0,09 % (m/m) y una turbidez de 7190±101 NTU.

5.4 COMPARACIÓN DEL RENDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE JUGO DE ZANAHORIA A NIVEL DE LABORATORIO A DOS TERMPERATURAS DE TRATAMIENTO ENZIMÁTICO: 25 Y T1 °C

Después de seleccionar las condiciones óptimas de proceso (tiempo y concentración de preparado enzimático) en las que se llevó a cabo el tratamiento enzimático de la pulpa de zanahoria a T1 °C, se comparó el rendimiento de extracción de jugo y algunas características físico-químicas de este a dos temperaturas de incubación distintas. Para ello se realizó el tratamiento enzimático en las condiciones óptimas definidas (P1, C1 ppm, X1 min) a 25 y T1 °C (donde T1 °C es mayor que 25 °C) previamente a la extracción del jugo; asimismo se realizó la extracción del jugo según el proceso convencional. Los resultados obtenidos se presentan en el Cuadro XX.

Cuadro XX. Evaluación del rendimiento de extracción de jugo de zanahoria a nivel de laboratorio y de algunas características físicas y químicas este, en función de la temperatura de tratamiento enzimático empleando el preparado P1 en una concentración de C1 ppm y un tiempo de incubación de X1 min†.

Parámetro evaluado		Tratamiento		
		Proceso convencional	Proceso enzimático	
			25 °C	T1 °C
Rendimiento de extracción de jugo (% m/m)		66,6±0,6^{c}	71,6±0,9^{b}	77,4±0,8^{a}
pH		4,62±0,01^{a}	4,53±0,02^{b}	4,46±0,02^{c}
Sólidos solubles (°Brix)		9,03±0,05^{c}	9,56±0,11^{b}	9,8±0,2^{a}
Sólidos insolubles en suspensión (% m/m)		2,57±0,06^{a}	2,60±0,06^{a}	1,97±0,09^{b}
Turbidez (NTU)		13070±642^{a}	10261±148^{b}	7190±101^{c}
Color	*L**	54,25±0,10^{a}	53,2±0,1^{b}	50,0±0,4^{c}
	*C**	76,5±0,2^{a}	75,92±0,09^{b}	72,8±0,3^{c}
	H°	55,9±0,2^{a}	55,79±0,06^{a}	54,2±0,2^{b}
Sólidos totales (% m/m)**		9,23±0,08^{ab}	9,44±0,02^{a}	9,12±0,08^{b}
Carotenoides totales (µg β-caroteno/g muestra)	Base húmeda	98,2±1,1^{b}	105,5±1,1^{a}	71,2±0,9^{c}
	Base seca	1063±21^{b}	1118±9^{a}	780±16^{c}

†Datos reportados como promedio ± intervalo de confianza (n = 3 para todas las variables excepto carotenoides totales y sólidos totales, donde n = 2) con un nivel de confianza del 95 %. Dentro de una misma fila, promedios con distinta letra son significativamente diferentes (Tukey-Kramer HSD, $p<0,05$). ** Análisis realizados por el Laboratorio de Química del CITA.

Rendimiento de extracción de jugo, pH y sólidos solubles

Con respecto al proceso convencional, el rendimiento de extracción de jugo aumentó significativamente en un 5,0 % (m/m) al aplicar el tratamiento enzimático a 25 °C, mientras que al llevarlo a cabo a T1 °C, el incremento se duplicó, obteniéndose un 10,8 % (m/m). En el caso del pH, la muestra tratada a T1 °C presentó el menor valor, seguida por la muestra a 25 °C y la obtenida a través del proceso control; lo contrario ocurrió con el contenido de sólidos solubles, donde la muestra tratada a mayor temperatura presentó el mayor contenido de °Brix.

La velocidad de las reacciones enzimáticas se incrementa al aumentar la temperatura en el intervalo donde la enzima es estable y retiene su capacidad catalítica (Badui, 1999). Por lo tanto, era esperado que al realizar el tratamiento enzimático a T1 °C se obtuviera un mayor rendimiento de extracción y un producto con menor pH y mayor contenido de sólidos

solubles, debido a una más rápida acción de la enzima. Sin embargo, es importante mencionar con base en observaciones anteriores, que la temperatura por sí misma, propicia el aumento en el contenido de sólidos solubles cuando se realiza un tratamiento enzimático.

Sólidos insolubles en suspensión y turbidez

El contenido de sólidos insolubles en suspensión no se vio afectado al realizar el tratamiento enzimático a 25 °C en comparación con el proceso convencional, mientras que disminuyó en 0,60 % (m/m) al llevarlo a cabo a T1 °C. En el caso de la turbidez, esta disminuyó en 2809 NTU y 5880 NTU al realizar el tratamiento a 25 y T1 °C, respectivamente, en comparación con el proceso convencional.

Lo anterior evidencia que cuando se realiza el tratamiento enzimático a una temperatura de T1 °C, se propicia la disminución del contenido de sólidos insolubles en suspensión y la turbidez. En este caso, es importante resaltar con base en resultados anteriores, que además de la adición de enzimas, la temperatura por sí misma influencia la disminución de ambos parámetros.

Color

Con respecto al color, el jugo obtenido a T1 °C presentó una mayor disminución en la luminosidad y el *Chroma* con respecto al jugo obtenido mediante el proceso convencional, en comparación con el obtenido a 25 °C; el *Hue* por su parte, no se vio afectado al realizar el tratamiento a 25 °C, y este disminuyó al llevarlo a cabo a T1 °C.

Lo anterior indica que el color del jugo obtenido a T1 °C es más opaco, menos vivaz y tiende en mayor medida hacia el color rojo que hacia el amarillo, en contraste con el obtenido al 25 °C. En el caso de la disminución de la luminosidad y el *Chroma*, como ya ha sido mencionado, lo observado se puede deber al favorecimiento de reacciones de oxidación enzimática y a la pérdida de carotenoides.

Sólidos totales

No se observó diferencia entre el contenido de sólidos totales obtenido para el proceso convencional y al aplicar el tratamiento a ambas temperaturas.

Carotenoides totales

El contenido de carotenoides totales, tanto en base húmeda como seca, se incrementó al realizar el tratamiento enzimático a 25 °C en comparación con el jugo elaborado mediante el proceso convencional; sin embargo, estos compuestos se vieron disminuidos en el jugo tratado a T1 °C. El comportamiento observado a 25 °C se puede atribuir a que durante el procesamiento las enzimas propician la liberación de los carotenoides de las estructuras del vegetal. A T1 °C posiblemente se favorecieron las reacciones de oxidación enzimática y no enzimática y la degradación térmica de los carotenoides, pues se ha establecido, sin importar cuál sea el método de procesamiento, que la degradación de los carotenoides se incrementa con las altas temperaturas (Rodríguez-Amaya & Kimura, 2004).

En síntesis, al llevar a cabo el tratamiento enzimático en pulpa de zanahoria en las condiciones óptimas definidas (P1, C1 ppm, X1 min) a una temperatura de incubación de T1 °C, se obtiene un mayor rendimiento de extracción de jugo y un menor contenido de sólidos insolubles en suspensión y turbidez, en comparación con lo que se obtiene cuando este se realiza a 25 °C; lo cual es de enorme interés para la industria. Además, a T1 °C se obtiene un jugo con mayor contenido de sólidos solubles y menor pH; sin embargo, con menor contenido de carotenoides totales y un color menos atractivo.

5.5 IMPLEMENTACIÓN DEL PROCESO QUE INVOLUCRA EL TRATAMINETO ENZIMÁTICO ÓPTIMO PARA LA EXTRACCIÓN DE JUGO DE ZANAHORIA A NIVEL DE PLANTA PILOTO E INDUSTRIAL

Con el objetivo de implementar el tratamiento enzimático óptimo como parte del proceso de fabricación de jugo de zanahoria en la industria, y de comparar el rendimiento de extracción obtenido a partir del proceso de elaboración convencional (actual) con el obtenido al aplicar el tratamiento enzimático acoplado a una etapa de acidificación en la molienda, así como también las características físico-químicas del jugo, se realizaron pruebas de implementación a nivel de planta piloto e industrial.

Estas pruebas fueron importantes y necesarias para lograr implementar el tratamiento enzimático en la industria y obtener resultados reales, con base en los cuales la empresa pueda estudiar la factibilidad económica de la presente propuesta. Al ser los alimentos una

mezcla de sistemas físicos y químicos en interacción, está establecido que los lotes de productos escalados no van a ser iguales a los originales o de laboratorio (Scott *et al.*, s.f.).

En el presente proyecto, el mayor reto en la implementación del proceso a nivel industrial fue enfrentar los grandes cambios que representan los equipos de procesamiento a gran escala, además de acoplar la línea de producción convencional a un tanque con calentamiento para realizar el tratamiento enzimático de la pulpa.

Primeramente, se observa en el Cuadro XXI el resultado obtenido durante la implementación del proceso a nivel de planta piloto, utilizando lotes de 15 kg de zanahoria pelada. Es posible notar que a nivel de planta piloto se obtuvo un rendimiento significativamente mayor al obtenido previamente a nivel de laboratorio, lo cual se puede deber tanto a la variabilidad entre los lotes de materia prima utilizados para ambas pruebas, como a la diferencia en los equipos para realizar la extracción y la realización del prensado en caliente.

Cuadro XXI. Evaluación del rendimiento de extracción de jugo de zanahoria fabricado a escala de planta piloto y de laboratorio, mediante la aplicación de un tratamiento enzimático con P1 en una concentración de C1 ppm, con un tiempo de incubación de X1 min y una temperatura de T1 °C *.

Parámetro evaluado	Planta piloto	Laboratorio
Rendimiento de extracción de jugo (% m/m)	84±3[a]	77,4±0,8[b]

*Datos reportados como promedio ± intervalo de confianza (n = 3) con un nivel de confianza del 95 %. Dentro de una misma fila, promedios con diferente letra son significativamente distintos (Prueba-t, $p < 0,05$).

Por otra parte, en el Cuadro XXII se presentan los resultados obtenidos durante la implementación a nivel industrial, para lo cual se partió de lotes de 100 kg de zanahoria pelada.

Cuadro XXII. Evaluación del rendimiento de extracción de jugo de zanahoria y de algunas características físicas y químicas del producto fabricado a nivel industrial, mediante la aplicación de un tratamiento enzimático con P1 en una concentración de C1 ppm, con un tiempo de incubación de X1 min y una temperatura de T1±1 °C; y mediante el proceso convencional†.

Parámetro evaluado		Zanahoria fresca	Jugo de zanahoria	
			Proceso convencional	Proceso enzimático
Rendimiento de extracción de jugo (% m/m)		NA	73±5^{b}	90±1^{a}
pH		6,1±0,2^{a}	4,44±0,06^{b}	4,19±0,08^{b}
Sólidos solubles (°Brix)		7,1±0,4	6,5±0,7	7,8±0,8
Sólidos insolubles en suspensión (% m/m)		NA	23±7^{a}	11±4^{b}
Turbidez		NA	9731±2277^{a}	5719±496^{b}
Color	*L**	51±2	48±2	47±2
	*C**	67±4	62±4	62±4
	H°	55,7±0,7^{a}	55,8±0,4^{a}	52,9±0,6^{b}
	ΔH°	NA	NA	3,2±0,3
	*ΔE**	NA	NA	3,4±0,6
Sólidos totales % (m/m)**		9,0±0,7^{a}	7,0±0,9^{b}	7,8±0,6^{ab}
Carotenoides totales (µg β-caroteno/g muestra)	Base húmeda	100±12^{a}	96±6^{a}	62±8^{b}
	Base seca	1112±166^{ab}	1385±194^{a}	805±133^{b}
Estabilidad relativa la turbidez (%)		NA	0,5±0,2^{b}	8±2^{a}

†Datos reportados como promedio ± intervalo de confianza (n = 3) con un nivel de confianza del 95 %. Dentro de una misma fila, promedios con diferente letra son significativamente distintos (Prueba-t o Tukey-Kramer HSD según corresponde, $p < 0,05$). NA: No aplica. ** Análisis realizados por el Laboratorio de Química del CITA.

En la producción de jugo de zanahoria, el rendimiento de extracción, el contenido de carotenoides, el color y la estabilidad a la turbidez, son parámetros de calidad importantes (Liao *et al.*, 2007). Hoy en día, las enzimas son utilizadas en el proceso de elaboración de jugo de zanahoria, ya que la hidrólisis enzimática de los constituyentes de la pared celular de esta, ofrece numerosas ventajas en la producción, como alto rendimiento de extracción, mejor color y mayor estabilidad a la turbidez, con respecto al jugo producido de manera convencional a través de únicamente el prensado mecánico de la pulpa (Qin *et al.*, 2005).

Como puede observarse en los datos mostrados en el Cuadro XXII, mediante la implementación de un tratamiento enzimático de la pulpa de zanahoria, dentro del proceso industrial convencional de producción de jugo, con P1 en una concentración de C1 ppm, con un tiempo de incubación de X1 min y una temperatura de T1±1 °C, se logró mejorar notablemente algunos de los parámetros mencionados.

Rendimiento de extracción de jugo

El rendimiento de extracción de jugo aumentó significativamente en 17 % (m/m) para el proceso enzimático en comparación con el convencional, lo cual es beneficioso desde el punto de vista económico, debido a la obtención de una mayor cantidad de jugo; así como también desde la perspectiva ambiental, al presentar la oportunidad de reducir la cantidad de residuos generados.

Se dice que cuando se realiza la trituración mecánica de productos ricos en pectina, como la zanahoria, se produce un jugo altamente viscoso, que permanece unido a la pulpa en forma de una masa gelificada y es difícil de extraer mediante métodos mecánicos. La adición de pectinasas propicia que la viscosidad de los jugos disminuya y que la facilidad de prensado mejore, pues al desintegrarse la estructura del gel el jugo es fácilmente obtenido con mayor rendimiento (Kashyap *et al.*, 2001).

pH, sólidos solubles y sólidos totales

No se observó diferencia significativa en el pH del jugo de zanahoria producido mediante los procesos enzimático y convencional (potencia de la prueba (1-β) = 1,000), así como tampoco en el contenido de sólidos solubles (1-β = 0,429) ni de sólidos totales (1-β = 0,720).

Es importante destacar, que para realizar las tres pruebas a escala industrial, se partió de lotes de zanahoria distintos sin considerar el efecto del bloque, y es de esperar que tanto el rendimiento como la calidad del jugo de zanahoria varíe con la condición de cada lote en particular (Sun *et al.*, 2006).

Sólidos insolubles en suspensión y turbidez

El contenido de sólidos insolubles en suspensión y la turbidez, disminuyeron en 12 % (m/m) y 4012 NTU respectivamente, al realizar el tratamiento enzimático. Estos resultados son

favorables desde el punto de vista de la calidad del jugo, debido a que existe un máximo de partículas insolubles permitido en el producto.

Además de incrementar el rendimiento del proceso de extracción de jugo y disminuir por consiguiente la cantidad de desechos generados, la implementación del tratamiento enzimático representa una oportunidad para eliminar la operación de tamizado posterior a la extracción de jugo, que actualmente se realiza en el proceso convencional para reducir el contenido de material insoluble, el cual contribuye a la obtención de un menor rendimiento general del proceso.

Color

Mediante la implementación del tratamiento enzimático, se logró además mejorar notablemente el color del jugo obtenido. Instrumentalmente se encontró una pequeña diferencia en la tonalidad, que indicó que el color del jugo tratado enzimáticamente tendió más hacia el color rojo que hacia el amarillo; y no se encontró diferencia significativa en la luminosidad ($1-\beta = 0{,}421$) ni la vivacidad del color ($1-\beta = 0{,}315$). La potencia de la prueba fue baja debido a la alta variabilidad entre los lotes de zanahoria estudiados.

La diferencia de color para el jugo tratado enzimáticamente con respecto al obtenido mediante el proceso convencional fue de $3{,}4 \pm 0{,}6$ unidades. Liao *et al.* (2007) mencionan que se considera que una diferencia de color de 2 unidades representa una diferencia visual notable para un gran número de situaciones. Al igual que en el presente estudio, dichos autores determinaron que mediante la aplicación de un tratamiento enzimático se obtiene un jugo de zanahoria con un color significativamente más rojo, en comparación con el jugo control (Liao *et al.*, 2007).

Los instrumentos para analizar el color en alimentos se basan en principios físicos, y su habilidad para simular la percepción humana del color es limitada, debido a que el proceso en que se percibe el color es muy complejo y a que las diferencias en las habilidades entre las personas es elevada (Socaciu & Diehl, 2009).

Tomando en cuenta lo anteriormente descrito, se decidió realizar una prueba sensorial de preferencia con base en el color entre ambos jugos fabricados, a partir de la cual se determinó que el jugo obtenido mediante la aplicación del tratamiento enzimático fue preferido de una

forma muy significativa por el consumidor, con una probabilidad menor a 0,001 tal como se puede observar a continuación en el Cuadro XXIII.

Cuadro XXIII. Datos obtenidos para la determinación de la preferencia del consumidor por el jugo de zanahoria elaborado a nivel industrial, mediante un tratamiento enzimático o de manera convencional, con base en su color.

Tamaño de muestra	Número de respuestas coincidentes		Probabilidad*
	Prefiere jugo tratado enzimáticamente	Prefiere jugo no tratado enzimáticamente	
75	67	8	<0,001**

*Probabilidad asociada a la significancia en la preferencia del jugo tratado enzimáticamente.
**Fuente: Roessler *et al.*, 1978.

El hecho de que los consumidores sean atraídos por el color del jugo elaborado mediante el tratamiento enzimático acoplado a una etapa de acidificación en la molienda, es muy positivo, ya que el color es una propiedad intrínseca de los alimentos con base en el cual los consumidores concluyen sobre su frescura y calidad (Socaciu & Diehl, 2009).

Carotenoides totales

El contenido de carotenoides totales disminuyó significativamente en 580 μg β-caroteno/g muestra en base seca para el jugo tratado enzimáticamente en comparación con el producido mediante el proceso convencional; lo cual es un aspecto negativo de la aplicación del tratamiento, cuyas causas han sido ampliamente explicadas en las secciones anteriores.

Estabilidad relativa a la turbidez

La estabilidad a la turbidez es una gran preocupación para los productores de jugo de zanahoria; al ser este generalmente turbio, es importante prevenir la pérdida de la estabilidad a la turbidez en el proceso de extracción de jugo (Sun *et al.*, 2006). En el presente estudio fue posible mejorar la estabilidad a la turbidez del producto, que aumentó de un 0,5 % a un 8 % para el jugo tratado enzimáticamente.

El efecto del tratamiento enzimático en la estabilidad a la turbidez es contradictorio entre varios estudios (Liao *et al.*, 2007). En algunos casos se ha visto que esta no es afectada por el tratamiento enzimático (Reiter *et al.*, 2003), mientras que en otros estudios se ha determinado que esta es mejorada al aplicar el tratamiento (Liao *et al.*, 2007).

La inestabilidad a la turbidez ocurre debido a que durante el almacenamiento, las partículas suspendidas que contiene el jugo de zanahoria se agregan y sedimentan debido a la acción de la gravedad. Esta depende de la viscosidad de la fase continua, la densidad, el tamaño y las fuerzas de atracción de las partículas (Qin *et al.*, 2005).

En este punto, es trascendental destacar que entre el jugo producido a través del proceso convencional y el tratado enzimáticamente existió una diferencia adicional a la aplicación del tratamiento enzimático. En el primer caso, la acidificación se realizó directamente en el jugo después del prensado, tal como se realiza normalmente en la industria.

En contraste, para obtener el jugo tratado enzimáticamente, la etapa de acidificación se llevó a cabo durante la molienda de las zanahorias, con el fin de asegurar las condiciones óptimas de trabajo para las enzimas previamente a la aplicación del tratamiento enzimático, y de evitar la contaminación microbiana del producto (Novozymes, 2004).

Se ha establecido que dependiendo de la etapa del proceso en que se realice la acidificación, la adición de ácido cítrico afecta en gran medida la formación de sedimentos en jugos de zanahoria (Reiter *et al.*, 2003). Al comparar la acidificación de las zanahorias en la molienda gruesa con la adición de ácido directamente en el jugo, Reiter *et al.* (2003) determinaron que la acidificación en la molienda gruesa resulta en la mayor estabilidad a la turbidez (no resulta en inestabilidad visible), mientras que cuando se acidifica el jugo previamente a la pasteurización, este resulta inestable.

Con base en pruebas preliminares realizadas al respecto, se cree que el aumento en la estabilidad del jugo tratado enzimáticamente se debe a la acidificación de las zanahorias en la molienda y no a la aplicación del tratamiento enzimático.

En síntesis, para la producción industrial de jugo de zanahoria de alta calidad y con un rendimiento aproximado de 90 % (m/m), se recomienda la implementación de un tratamiento enzimático en pulpa acidificada a pH1, utilizando el preparado P1 en una concentración de C1 ppm, durante un tiempo de incubación X1 min a una temperatura de T1 °C.

Es importante destacar que en las condiciones en que se llevó a cabo el experimento, una vez calentada la pulpa a T1 °C, no fue necesario continuar con el suministro de vapor para mantener la temperatura superior a T1-2 °C durante la totalidad del tratamiento. Por otra

parte, debido a que en la práctica es difícil mantener las condiciones recomendadas durante el procesamiento, cierta variación en las respuestas es esperada (Sun *et al.*, 2006).

Se recomienda evaluar la oportunidad que representa la implementación de un tratamiento enzimático para la producción de jugo de zanahoria a nivel industrial, considerando el requerimiento de equipo y la necesidad de acoplar la línea de producción de acuerdo con el nuevo proceso, el incremento en los costos directos (preparado enzimático y ácido cítrico) e indirectos (tiempo de proceso) versus el incremento en el rendimiento de extracción de jugo, la mejora de las características físicas y químicas de este y la reducción en la cantidad de residuos generados.

VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 CONCLUSIONES

- Con base en pruebas realizadas a nivel de laboratorio, desde el punto de vista técnico y económico, P1 es el preparado enzimático comercial recomendado para maximizar el rendimiento de extracción de jugo de zanahoria.
- Al optimizar, a nivel de laboratorio, los parámetros de tratamiento enzimático de pulpa de zanahoria (tiempo de incubación y concentración de preparado enzimático), mediante la metodología de superficie de respuesta, para maximizar el rendimiento de extracción de jugo y minimizar el contenido de sólidos insolubles en suspensión y la turbidez, se recomienda realizar un tratamiento enzimático a nivel industrial empleando una concentración de C1 ppm de P1 durante un tiempo de X1 min a una temperatura de T1 °C.
- Al realizar, a nivel de laboratorio, un tratamiento enzimático en pulpa de zanahoria empleando una concentración de C1 ppm de P1 durante un tiempo de X1 min a una temperatura de T1 °C, se mejoró el rendimiento de extracción de jugo de zanahoria en un 5,8 % (m/m) en comparación con el obtenido al realizar el tratamiento a temperatura ambiente (25 °C) en las mismas condiciones de tiempo y concentración.
- Asimismo, a nivel de laboratorio, la aplicación del tratamiento enzimático a una temperatura de T1 °C permitió mejorar algunas características físicas y químicas del jugo de zanahoria, al incrementar el contenido de sólidos solubles en 0,24 °Brix y disminuir el pH, los sólidos insolubles en suspensión y la turbidez en 0,07 unidades, 0,63 % (m/m) y 3071 NTU respectivamente, en comparación con el tratamiento a 25 °C. Sin embargo, los carotenoides totales fueron degradados en un 33 %.
- A través de la implementación de un tratamiento enzimático en pulpa de zanahoria a nivel industrial en las condiciones de operación recomendadas (C1 ppm de P1, X1 min, T1 °C, pH1) partiendo de lotes de 100 kg de materia prima, fue posible aumentar el rendimiento de extracción de jugo de zanahoria en un 17 % en comparación con el proceso convencional.
- Asimismo, fue posible mejorar algunas características físicas y químicas del jugo producido a nivel industrial mediante la aplicación del tratamiento enzimático, al disminuir el contenido de sólidos insolubles en suspensión y la turbidez del jugo y

mejorar el color y la estabilidad a la turbidez; sin embargo, los carotenoides totales fueron degradados en un 35 %.

- El jugo tratado enzimáticamente se obtuvo a nivel industrial con un rendimiento de 90±1 % (m/m), presentó un pH de 4,19, 7,8 °Brix, 11±4 % (m/m) de sólidos insolubles en suspensión, una turbidez de 5719±496 NTU, 62±8 μg β-caroteno/g de muestra (carotenoides totales) y un 8 % de estabilidad relativa a la turbidez.

6.2 RECOMENDACIONES

- Con base en los resultados obtenidos, que permitieron determinar el aumento en el rendimiento de extracción de jugo de zanahoria a nivel industrial, al implementar un tratamiento enzimático en las condiciones de operación definidas, se recomienda a la industria evaluar la factibilidad técnica y económica de este nuevo flujo de proceso propuesto para la elaboración de jugo de zanahoria.
- En respuesta a las necesidades de mejora del proceso convencional por parte de la empresa, en relación con el incremento en la estabilidad relativa a la turbidez del jugo de zanahoria, se recomienda implementar una etapa de acidificación de las zanahorias en la molienda hasta alcanzar el pH determinado según las especificaciones del producto terminado.
- Se recomienda determinar el contenido de metanol en el jugo de zanahoria tratado enzimáticamente, el cual es un compuesto indeseable en el procesamiento de jugos de frutas y de vegetales que puede producirse por la hidrólisis enzimática de algunas sustancias pécticas.

VII. BIBLIOGRAFÍA

ABDULLAH, A.G.L., SULAIMAN, N.M., AROUA, M.K. & NOOR, M.J.M.M. 2007. Response surface optimization of conditions for clarification of carambola fruit juice using a commercial enzyme. Journal of Food Engineering. 81(1): 65-71.

ALFARO, A. 2011. Producción de zanahoria en la zona de Zarcero para los años 2010 y 2011. Zarcero. Comunicación personal.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION & AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION. 2008. Seleccione sus alimentos: listas de intercambios para la Diabetes. Alexandría & Ilinois.

AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH. 2001. AICR Guidelines for cancer prevention: the facts about fiber. Washington. INTERNET. http://preventcancer.aicr.org/site/DocServer/FPC-E7B-FIW.pdf?docID=1547 (28/01/2011).

AOAC. 2005c. Official methods of analysis: Official method 920.151 solids (total) in fruits and fruit products. 18 ed. Maryland, AOAC International. INTERNET. http://www.eoma.aoac.org/ (24/05/2010)

AOAC. 2005d. Official methods of analysis: Official method 920.152 protein in fruit products. 18 ed. Maryland, AOAC International. INTERNET. http://www.eoma.aoac.org/ (13/04/2011).

AOAC. 2005a. Official methods of analysis: Official method 932.12 solids (soluble) in fruits and fruit products. 18 ed. Maryland, AOAC International. INTERNET. http://www.eoma.aoac.org/ (24/05/2010).

AOAC. 2005e. Official methods of analysis: Official method 940.26 ash of fruits and fruit products. 18 ed. Maryland, AOAC International. INTERNET. http://www.eoma.aoac.org/ (13/04/2011).

AOAC. 2005g. Official methods of analysis: Official method 942.15 acidity (titratable) of fruit products. 18 ed. Maryland, AOAC International. INTERNET. http://www.eoma.aoac.org/ (13/04/2011).

AOAC. 2005b. Official methods of analysis: Official method 981.12 pH of acidified foods. 18 ed. Maryland, AOAC International. INTERNET. http://www.eoma.aoac.org/ (24/05/2010)

AOAC. 2005f. Official methods of analysis: Official method 985.29 total dietary fiber in foods. 18 ed. Maryland, AOAC International. INTERNET. http://www.eoma.aoac.org/ (13/04/2011).

ASHURST, P. 2009. New directions in fruit juice processing. *In* Paquin, P., ed. Functional and speciality beverages technology. CRC Press, Boca Ratón. p. 299-317.

BADUI, S. 1999. Química de los alimentos. Alhambra Mexicana, México.

BATES, R.P., MORRIS, J.R. & CRANDALL, P.G. 2001. Principles and practices of small- and medium-scale fruit juice processing. FAO, Roma.

BAYINDIRLI, A. 2010. Introduction to enzymes. *In* Bayindirli, A., ed. Enzymes in fruit and vegetable processing: chemistry and engineering applications. CRC Press, Boca Ratón. p. 1-18.

BELITZ, H.D. & GROSCH, W. 1992. Química de los alimentos. 2 ed. Acribia, Zaragoza.

BERG, H. VAN DEN, FAULKS, R., FERNANDO-GRANADO, H., HIRSCHBERG, J., OLMEDILLA, B., SANDMANN, G., SOUTHON, S. & STAHL, W. 2000. The potential for the improvement of carotenoid levels in foods and the likely systemic effects. Journal of the Science of Food and Agriculture. 80(7): 880-912.

BERG, M.A. VAN DEN, ROUBOS, J.A. & PARENICOVÁ, L. 2010. Enzymes in fruit and vegetable processing: Future trends in enzyme discovery, design, production and application. *In* Bayindirli, A., ed. Enzymes in fruit and vegetable processing: chemistry and engineerig applications. CRC Press, Boca Ratón. p. 341-358.

BRITTON, G. 1995. Structure and properties of carotenoids in relation to function. FASEB Journal. 9(15): 1551-1558.

BUCHERT, J., KOPONEN, J.M., SUUTARINEN, M., MUSTRANTA, A., LILLE, M., TÖRRÖNEN, R. & POUTANEN, K. 2005. Effect of enzyme-aided pressing on anthocyanin yield and profiles in bilberry and blackcurrant juices. Journal of the Science of Food and Agriculture. 85(15): 2548-2556.

CÁMARA AGROPECUARIA Y AGROINDUSTRIAL DE EL SALVADOR. 2005. Manual de manejo postcosecha de hortalizas. CAMAGRO, El Salvaror.

CARPENTER, D., NGEH-NGWAINBI, J. & LEE, S. 1993. Lipid analysis: methods of analysis for nutrition labeling. s.l., AOAC International.

CECI, L.N. & LOZANO, J.E. 2010. Use of enzymes for non-citrus fruit juices production. *In* Bayindirli, A., ed. Enzymes in fruit and vegetable processing: chemistry and engineerig applications. CRC Press, Boca Ratón. p. 175-195.

CHADHA, R., KUMBHAR, B.K. & SARKAR, B.C. 2003. Enzymatic hydrolysis of carrot for increased juice recovery. Journal of Food Science and Technology-Mysore. 40(1): 35-39.

CHANTARO, P., DEVAHASTIN, S. & CHIEWCHAN, N. 2008. Production of antioxidant high dietary fiber powder from carrot peels. LWT - Food Science and Technology. 41(10): 1987-1994.

CODEX. 2010. Codex stan 1-1985 Norma general para el etiquetado de los alimentos preenvasados. s. l.

CODEX. 2005. Codex stan 247: 2005 Norma general del Codex para zumos (jugos) y néctares de frutas. s. l.

CODEX. CAC/GL. 2010. CAC/GL 75-2010 Directrices para sustancias utilizadas como coadyuvantes de elaboración. s. l.

COSTA RICA. ASAMBLEA GENERAL DE LA REPÚBLICA. 2010. Ley para la gestión integral de residuos. No. 8839. San José.

COSTA RICA. PRESIDENTE DE LA REPÚBLICA, MINISTERIO DE ECONOMÍA INDUSTRIA Y COMERCIO Y MINISTRA DE SALUD. 2005. RTCR 390: 2005 Reglamento técnico jugos y néctares de frutas. No. 32916. San José.

COSTA RICA. PRESIDENTE DE LA PEPÚBLICA Y MINISTERIO DE ECONOMÍA INDUSTRIA Y COMERCIO. 1997. RTCR 100: 1997 Etiquetado de los alimentos preenvasados. No. 26012. San José.

DEMIR, N., ACAR, J. & BAHCECI, K.S. 2004. Effects of storage on quality of carrot juices produced with lactofermentation and acidification. European Food Research and Technology. 218(5): 465-468.

DEMIR, N., BAHCECI, K.S. & ACAR, J. 2007. The effect of processing method on the characteristics of carrot juice. Journal of Food Quality. 30(5): 813-822.

DINNELLA, C., SIO, G. DE, MONTELEONE, E., PALMIERI, L. & IMPEMBO, M. 2000. Effects of enzyme treatment on characteristics of carrot juices. Industrie delle Bevande. 29(169): 490-493.

EL-AGAMEY, A., LOWE, G.M., McGARVEY, D.J., MORTENSEN, A., PHILLIP, D.M., TRUSCOTT, T.G. & YOUNG, A.J. 2004. Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. Archives of Biochemistry and Biophysics. 430(1): 37-48.

ELBE, J.H. VON & SCHWARTZ, S.J. 1996. Colorants. *In* Fennema, O.R., ed. Food chemistry. 3 ed. Marcel Dekker, New York. p. 651-722.

FAOSTAT. 2011. Top production: carrots and turnips 2009. FAO, s. l. INTERNET http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx (15/01/2012).

FDA. 2010. Guidance for industry: enzyme preparations: recommendations for submission of chemical and technological data for food additive petitions and GRAS notices. s. l. INTERNET. http://www.fda.gov/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/FoodIngredientsandPackaging/ucm217685.htm (27/01/2011).

FELLOWS, P. 1994. Tecnología del procesado de los alimentos: principios y prácticas. Acribia, Zaragoza.

GEORGE, S., BRAT, P., ALTER, P. & AMIOT, M.J. 2005. Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53(5): 1370-1373.

GIACOMO, G. DI & TAGLIERI, L. 2009. A new high-yield process for the industrial production of carrot juice. Food & Bioprocess Technology. 2(4): 441-446.

GREGORY, J.F. 1996. Vitamins. *In* Fennema, O.R., ed. Food chemistry. 3 ed. Marcel Dekker, New York. p. 531-616.

HAYTOWITZ, D.B. & BHAGWAT, S. 2010. USDA Database for the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) of selected foods, release 2. USDA, Maryland.

HUANG, D., OU, B., HAMPSCH-WOODILL, M., FLANAGAN, J.A. & PRIOR, R.L. 2002. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 50(16): 4437-4444.

HUNTERLAB. 2008a. Applications Note: CIE L*a*b* color scale. Virginia, HunterLab.

HUNTERLAB. 2008b. Applications Note: CIE L*C*h* color scale. Virginia, HunterLab.

JAYANI, R.S., SAXENA, S. & GUPTA, R. 2005. Microbial pectinolytic enzymes: a review. Process Biochemistry. 40(9): 2931-2944.

KALT, W. 2005. Effects of production and processing factors on major fruit and vegetable antioxidants. Journal of Food Science. 70(1): R11-R19.

KASHYAP, D.R., VOHRA, P.K., CHOPRA, S. & TEWARI, R. 2001. Applications of pectinases in the commercial sector: A review. Bioresource Technology. 77(3): 215-227.

KHANNA, S., PARRETT, A. & EDWARDS, C.A. 2006. Nondigestible carbohydrates: nutritional aspects. *In* Eliasson, A.C., ed. Carbohydrates in food. 2 ed. CRC Press, Boca Ratón. p. 273-303.

KOTCHARIAN, A., KUNZEK, H. & DONGOWSKI, G. 2004. The influence of variety on the enzymatic degradation of carrots and on functional and physiological properties of the cell wall materials. Food Chemistry. 87(2): 231-245.

LANDBO, A.K., KAACK, K. & MEYER, A.S. 2007. Statistically designed two step response surface optimization of enzymatic prepress treatment to increase juice yield and lower turbidity of elderberry juice. Innovative Food Science & Emerging Technologies. 8(1): 135-142.

LIAO, H., SUN, Y., NI, Y., LIAO, X., HU, X., WU, J. & CHEN, F. 2007. The effect of enzymatic mash treatment, pressing, centrifugation, homogenization, deaeration, sterilization and storage on carrot juice. Journal of Food Process Engineering. 30(4): 421-435.

LÓPEZ, A.F. 2003. Manual para la preparación y venta de frutas y hortalizas. FAO, Roma.

LOZANO, J.E. 2006. Fruit manufacturing: scientific basis, engineering properties, and deteriorative reactions of technological importance. Springer, USA.

MARCUS, R.T. 1999. Colorimetry. *In* Webster, J.G., ed. The measurement, instrumentarion & sensors handbook. v. 2. CRC Press, Florida.

McLELLAN, M.R. & PADILLA-ZAKOUR, O.I. 2005. Juice processing. *In* Barrett, D.M., Somogyi, L. & Ramaswamy, H., eds. Processing fruits: science and technology. 2 ed. CRC Press, Boca Ratón.

MONTGOMERY, D.C. 2008. Diseño y análisis de experimentos. 2 ed. Limusa, México.

NOVOZYMES. 2001. Production of clear, stable juices and concentrates: guidelines on processing and quality control. Novozymes Switzerland AG, Switzerland.

NOVOZYMES. 2004. Ficha de aplicación: procesado de vegetales. Novozymes Latin American, Paraná.

OU, B., HAMPSCH-WOODILL, M. & PRIOR, R.L. 2001. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 49(10): 4619-4626.

PHILIP, T. & CHEN, T.S. 1988. Quantitative analyses of major carotenoid fatty acid esters in fruits by liquid chromatography: persimmon and papaya. Journal of Food Science. 53(6): 1720-1722.

PIRISINO, J.F. 1983. High performance liquid chromatographic determination of lactose, glucose, and galactose in lactose-reduced milk. Journal of Food Science. 48(3): 742-744.

PRIOR, R.L., HOANG, H., GU, L., WU, X., BACCHIOCCA, M., HOWARD, L., HAMPSCH-WOODILL, M., HUANG, D., OU, B. & JACOB, R. 2003. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance

capacity ($ORAC_{FL}$)) of plasma and other biological and food samples. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 51(11): 3273-3279.

PROCOMER. 2010. Estadísticas del comercio exterior 2009 Costa Rica. Dirección de inteligencia comercial. San José.

QIN, L., XU, S.Y. & ZHANG, W.B. 2005. Effect of enzymatic hydrolysis on the yield of cloudy carrot juice and the effects of hydrocolloids on color and cloud stability during ambient storage. Journal of the Science of Food and Agriculture. 85(3): 505-512.

RAISSI, S. 2009. Developing new processes and optimizing performance using response surface methodology. Proceedings of World Academy of Science, Engineering and Technology. 37: 1338-1341.

RAISSI, S. & FARSANI, R.E. 2009. Statistical process optimization through multi-response surface methodology. Proceedings of World Academy of Science, Engineering and Technology. 39: 280-284.

RAO, A.V. & RAO, L.G. 2007. Carotenoids and human health. Pharmacological Research. 55(3): 207-216.

REED, G. & NAGODAWITHANA, T.W. 1995. Enzymes, biomass, food and feed. *In* Rehm, H.J., Reed, G., Pühler, A. & Stadler, P., eds. Biotechnology. 2 ed. v. 9. VCH Publishers, New York.

REITER, M., STUPARIC, M., NEIDHART, S. & CARLE, R. 2003. The role of process technology in carrot juice cloud stability. Lebensmittel Wissenschaft und Technologie. 36(2): 165-172.

RICHMOND-ZUMBADO, F. & MÉNDEZ-SOTO, C. 2010. Rendimiento de 12 híbridos comerciales de znahoria (*Daucus carota L.*) en el campo y en la planta de empaque. Agronomía Mesoamericana. 21(1): 167-176.

RODRÍGUEZ-AMAYA, D.B. 2001. A guide to carotenoid analysis in food. ILSI Press, Washington.

RODRÍGUEZ-AMAYA, D.B. & KIMURA, M. 2004. HarvestPlus handbook for carotenoid analysis. HarvestPlus, Washington y Cali.

ROESSLER, E.B., PANGBORN, R.M., SIDEL, J.L. & STONE, H. 1978. Expanded statistical tables for estimating significance in paired-prederence, paired-difference, duo-trio and triangle tests. Journal of Food Science. 43(3): 940-943.

SCHIEBER. A. & CARLE, R. 2005. Review: Occurrence of carotenoid *cis*-isomers in food: Technological, analytical, and nutritional implications. Trends in Food Science and Technology. 16: 416-422.

SCOTT, D.D., BOWSER, T.J. & McGLYNN, W.G. s.f. Scaling up your food process. Food and Agricultural Products Research and Technology Center. 141-1414.

SHACHMAN, M. 2005. The soft drinks companion: a technical handbook for the beverage industry. CRC Press, Boca Ratón.

SHARMA, A.K., SARKAR, B.C. & SHARMA, H.K. 2005. Optimization of enzymatic process parameters for increased juice yield from carrot (*Daucus carota L.*) using response surface methodology. European Food Research and Technology. 221(1-2): 106-112.

SHARMA, H.K., KAUR, J., SARKAR, B.C., SINGH, C. & SINGH, B. 2009. Effect of pretreatment conditions on physicochemical parameters of carrot juice. International Journal of Food Science and Technology. 44(1): 1-9.

SHARMA, H.K., KAUR, J., SARKAR, B.C., SINGH, C., SINGH, B. & SHITANDI, A.A. 2006. Optimization of pretreatment conditions of carrots to maximize juice recovery by response surface methodology. Journal of Engineering Science and Technology. 1(2): 158-165.

SHARMA, K.D., KARKI, S., THAKUR, N.S. & ATTRI, S. 2010. Chemical composition, functional properties and processing of carrot—a review. Journal of Food Science and Technology. 1-11.

SIN, H.N., YUSOF, S., SHEIKH, N. & RAHMAN, R. 2006. Optimization of enzymatic clarification of sapodilla juice using response surface methodology. Journal of Food Engineering. 73(4): 313-319.

SOCACIU, C. & DIEHL, H.A. 2009. Instruments to analyze food colors. *In* Ötles, S., ed. Handbook of food analysis instruments. CRC Press, Boca Ratón. p. 229-246.

SORIA, A.C., SANZ, M.L. & VILLAMIEL, M. 2009. Determination of minor carbohydrates in carrot (*Daucus carota L.*) by GC–MS. Food Chemistry. 114(2): 758-762.

SUN, T., POWERS, J.R. & TANG, J. 2007. Effect of enzymatic macerate treatment on rutin content, antioxidant activity, yield, and physical properties of asparagus juice. Journal of Food Science. 72(4): S267-S271.

SUN, Y., WANG, Z., WU, J., CHEN, F., LIAO, X. & HU, X. 2006. Optimising enzymatic maceration in pretreatment of carrot juice concentrate by response surface methodology. International Journal of Food Science and Technology. 41(9): 1082-1089.

USDA. 2010. USDA National nutrient database for standard reference: carrots, raw. s. l. INTERNET. http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/cgi-bin/list_nut_edit.pl (09/07/2011).

USDA. s. f. USDA National nutrient database for standard reference, release 17: fiber, total dietary (g) content of selected foods per common measure, sorted alphabetically. s. l. INTERNET. http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/Data/SR17/wtrank/sr17a291.pdf (22/01/2010).

VAILLANT, F. 2011. Aplicación de diseños experimentales para la optimización de los procesos de investigación, de desarrollo de productos y de los sistemas de producción. s. e., San José.

VAILLANT, F., PÉREZ, A.M., ACOSTA, O. & DORNIER, M. 2008. Turbidity of pulpy fruit juice: a key factor for predicting cross-flow microfiltration performance. Journal of Membrane Science. 325: 404-412.

VANDANA, T. & GUPTA, D.K. DAS. 2006. Optimization of enzyme concentration, reaction time and temperature for carrot juice extraction. Journal of Food Science and Technology. 43(5): 470-473.

WHITAKER, J.R. 1996. Enzymes. *In* Fennema, O.R., ed. Food chemistry. 3 ed. Marcel Dekker, New York, p. 431-530.

VIII. ANEXOS

A.1 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA ZANAHORIA EMPLEADA COMO MATERIA PRIMA Y DEL JUGO DE ZANAHORIA FABRICADO A NIVEL INDUSTRIAL MEDIANTE EL PROCESO CONVENCIONAL, EXPRESADA EN BASE SECA (SECCIÓN 5.1)

Cuadro A I. Composición química de la zanahoria empleada como materia prima y del jugo de zanahoria fabricado a nivel industrial mediante el proceso convencional, expresada en base seca*.

Parámetro evaluado	Zanahoria fresca	Jugo de zanahoria
Carbohidratos disponibles (g/100 g)	55,6±0,3[b]	71±5[a]
Fibra dietética (g/100 g)	29±2[a]	8±2[b]
Proteína (g/100 g)	6,8±0,7	9±2
Cenizas (g/100 g)	6,8±1,0	8,5±0,8
Lípidos (g/100 g)	2,0±0,1[a]	1,35±0,06[b]

*Datos reportados como promedio ± intervalo de confianza (n=3) con un nivel de confianza del 95 %. Dentro de una misma fila, promedios con diferente letra son significativamente distintos (Prueba-t, p<0,05). Análisis realizados por el Laboratorio de Química del CITA.

A.2 PRUEBA t DE STUDENT PARA LOS RESULTADOS DE CARACTERIZACIÓN DEL PROCESO CONVENCIONAL DE ELABORACIÓN DE JUGO DE ZANAHORIA A NIVEL INDUSTRIAL (SECCIÓN 5.1)

Cuadro A II. Prueba t de Student para el contenido de humedad del jugo, según el tipo de producto.

	Diferencia	Prueba t	Grados de libertad	Probabilidad > |t|
Estimado	-4,4333	-3,31466	4	0,0295*
Error estándar	1,3375			

*Significativo.

Cuadro A III. Prueba t de Student para el contenido de carbohidratos totales, según el tipo de producto.

	Diferencia	**Prueba t**	**Grados de libertad**	**Probabilidad > |t|**
Estimado	4,16667	3,461555	4	0,0258*
Error estándar	1,20370			

*Significativo.

Cuadro A IV. Prueba t de Student para el contenido de carbohidratos disponibles en base seca, según el tipo de producto.

	Diferencia	**Prueba t**	**Grados de libertad**	**Probabilidad > |t|**
Estimado	15,1504	5,949	4	0,0040*
Error estándar	2,5468			

*Significativo.

Cuadro A V. Prueba t de Student para el contenido de fibra dietética, según el tipo de producto.

	Diferencia	**Prueba t**	**Grados de libertad**	**Probabilidad > |t|**
Estimado	2,80000	6,331738	4	0,0032*
Error estándar	0,44222			

*Significativo.

Cuadro A VI. Prueba t de Student para el contenido de fibra dietética en base seca, según el tipo de producto.

	Diferencia	**Prueba t**	**Grados de libertad**	**Probabilidad > |t|**
Estimado	-20,294	-13,669	4	0,0002*
Error estándar	1,485			

*Significativo.

Cuadro A VII. Prueba t de Student para el contenido de proteína, según el tipo de producto.

	Diferencia	**Prueba t**	**Grados de libertad**	**Probabilidad > |t|**
Estimado	0,13333	1,511858	4	0,2051
Error estándar	0,08819			

Cuadro A VIII. Prueba t de Student para el contenido de proteína en base seca, según el tipo de producto.

	Diferencia	Prueba t	Grados de libertad	Probabilidad > |t|
Estimado	2,1914	2,072	4	0,1070
Error estándar	1,0577			

Cuadro A IX. Prueba t de Student para el contenido de cenizas, según el tipo de producto.

	Diferencia	Prueba t	Grados de libertad	Probabilidad > |t|
Estimado	0,16333	2,769644	4	0,0503
Error estándar	0,05897			

Cuadro A X. Prueba t de Student para el contenido de cenizas en base seca, según el tipo de producto.

	Diferencia	Prueba t	Grados de libertad	Probabilidad > |t|
Estimado	1,7232	2,591	4	0,0606
Error estándar	0,6651			

Cuadro A XI. Prueba t de Student para el contenido de lípidos, según el tipo de producto.

	Diferencia	Prueba t	Grados de libertad	Probabilidad > |t|
Estimado	0,133333	4	4	0,0161*
Error estándar	0,033333			

*Significativo.

Cuadro A XII. Prueba t de Student para el contenido de lípidos en base seca, según el tipo de producto.

	Diferencia	Prueba t	Grados de libertad	Probabilidad > |t|
Estimado	-0,60723	-8,546	4	0,0010*
Error estándar	0,04105			

*Significativo.

Cuadro A XIII. Prueba t de Student para el contenido de acidez, según el tipo de producto.

	Diferencia	**Prueba t**	**Grados de libertad**	**Probabilidad > |t|**
Estimado	-0,07000	-1,92507	4	0,1265
Error estándar	0,03636			

Cuadro A XIV. Prueba t de Student para el contenido de sacarosa, según el tipo de producto.

	Diferencia	**Prueba t**	**Grados de libertad**	**Probabilidad > |t|**
Estimado	0,4333	0,69192	4	0,5271
Error estándar	0,6263			

Cuadro A XV. Prueba t de Student para el contenido de glucosa, según el tipo de producto.

	Diferencia	**Prueba t**	**Grados de libertad**	**Probabilidad > |t|**
Estimado	-0,46667	-2,59973	4	0,0601
Error estándar	0,17951			

Cuadro A XVI. Prueba t de Student para el contenido de fructosa, según el tipo de producto.

	Diferencia	**Prueba t**	**Grados de libertad**	**Probabilidad > |t|**
Estimado	-0,5333	-2,97113	4	0,0411*
Error estándar	0,1795			

*Significativo.

Cuadro A XVII. Prueba t de Student para el contenido de sólidos solubles (°Brix), según el tipo de producto.

	Diferencia	**Prueba t**	**Grados de libertad**	**Probabilidad > |t|**
Estimado	1,08667	4.552433	4	0,0104*
Error estándar	0,23870			

*Significativo.

Cuadro A XVIII. Prueba t de Student para el pH, según el tipo de producto.

	Diferencia	**Prueba t**	**Grados de libertad**	**Probabilidad > |t|**
Estimado	0,02167	0,291173	4	0,7854
Error estándar	0,07441			

Cuadro A XIX. Prueba t de Student para el contenido de carotenoides totales, según el tipo de producto.

	Diferencia	**Prueba t**	**Grados de libertad**	**Probabilidad > |t|**
Estimado	14,845	1,655978	4	0,1731
Error estándar	8,965			

Cuadro A XX. Prueba t de Student para el contenido de carotenoides totales en base seca, según el tipo de producto.

	Diferencia	**Prueba t**	**Grados de libertad**	**Probabilidad > |t|**
Estimado	-439,49	-6,46772	4	0,0029*
Error estándar	67,95			

*Significativo.

Cuadro A XXI. Prueba t de Student para la capacidad antioxidante (H-ORAC), según el tipo de producto.

	Diferencia	**Prueba t**	**Grados de libertad**	**Probabilidad > |t|**
Estimado	-0,2167	-0,35561	4	0,7401
Error estándar	0,6093			

Cuadro A XXII. Prueba t de Student para la capacidad antioxidante (H-ORAC) en base seca, según el tipo de producto.

	Diferencia	**Prueba t**	**Grados de libertad**	**Probabilidad > |t|**
Estimado	15,672	1,884	4	0,1326
Error estándar	8,317			

Cuadro A XXIII. Prueba t de Student para la luminosidad (L^*), según el tipo de producto.

	Diferencia	**Prueba t**	**Grados de libertad**	**Probabilidad > |t|**
Estimado	-2,3733	-2,797	4	0,0489†
Error estándar	0,8484			

†Significativo.

Cuadro A XXIV. Prueba t de Student para el *Chroma* (*C**), según el tipo de producto.

	Diferencia	**Prueba t**	**Grados de libertad**	**Probabilidad > |t|**
Estimado	-5,5567	-5,843	4	0,0043†
Error estándar	0,9510			

†Significativo.

Cuadro A XXV. Prueba t de Student para el *Hue* (*H*°), según el tipo de producto.

	Diferencia	**Prueba t**	**Grados de libertad**	**Probabilidad > |t|**
Estimado	0,0400	0,079	4	0,9406
Error estándar	0,5047			

A.3 ANÁLISIS DE VARIANZA (ANDEVA) PARA LOS RESULTADOS DE SELECCIÓN DEL PREPARADO ENZIMÁTICO MÁS ADECUADO PARA MAXIMIZAR EL RENDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE JUGO DE ZANAHORIA A NIVEL DE LABORATORIO (SECCIÓN 5.2)

Cuadro A XXVI. Análisis de varianza para el rendimiento de extracción de jugo, según el tratamiento aplicado.

Fuente de variación	**Grados de libertad**	**Valor F**	**Probabilidad > F**
Tratamiento	4	29,8835	< 0,0001*
Error	10		
Total	14		

*Significativo.

Cuadro A XXVII. Análisis de varianza para el pH del jugo, según el tratamiento aplicado.

Fuente de variación	**Grados de libertad**	**Valor F**	**Probabilidad > F**
Tratamiento	4	8,9030	0,0025*
Error	10		
Total	14		

*Significativo.

Cuadro A XXVIII. Análisis de varianza para el contenido de sólidos solubles (°Brix) del jugo, según el tratamiento aplicado.

Fuente de variación	Grados de libertad	Valor F	Probabilidad > F
Tratamiento	4	25,1364	< 0,0001*
Error	10		
Total	14		

*Significativo.

Cuadro A XXIX. Análisis de varianza para el contenido de sólidos insolubles en suspensión del jugo, según el tratamiento aplicado.

Fuente de variación	Grados de libertad	Valor F	Probabilidad > F
Tratamiento	4	58.0736	< 0,0001*
Error	10		
Total	14		

*Significativo.

Cuadro A XXX. Análisis de varianza para la turbidez del jugo, según el tratamiento aplicado.

Fuente de variación	Grados de libertad	Valor F	Probabilidad > F
Tratamiento	4	25,1117	< 0,0001*
Error	10		
Total	14		

*Significativo.

Cuadro A XXXI. Análisis de varianza para la luminosidad (L^*) del jugo, según el tratamiento aplicado.

Fuente de variación	Grados de libertad	Valor F	Probabilidad > F
Tratamiento	4	64,7198	< 0,0001†
Error	10		
Total	14		

†Significativo.

Cuadro A XXXII. Análisis de varianza para el *Chroma* (*C**) del jugo, según el tratamiento aplicado.

Fuente de variación	Grados de libertad	Valor F	Probabilidad > F
Tratamiento	4	142,7479	< 0,0001†
Error	10		
Total	14		

†Significativo.

Cuadro A XXXIII. Análisis de varianza para el *Hue* (H°) del jugo, según el tratamiento aplicado.

Fuente de variación	Grados de libertad	Valor F	Probabilidad > F
Tratamiento	4	50,8049	< 0,0001*
Error	10		
Total	14		

*Significativo.

Cuadro A XXXIV. Análisis de varianza para el contenido de sólidos totales del jugo, según el tratamiento aplicado.

Fuente de variación	Grados de libertad	Valor F	Probabilidad > F
Tratamiento	4	2,4297	0,1162
Error	10		
Total	14		

Cuadro A XXXV. Análisis de varianza para el contenido de carotenoides totales del jugo, según el tratamiento aplicado.

Fuente de variación	Grados de libertad	Valor F	Probabilidad > F
Tratamiento	4	43,8394	< 0,0001*
Error	10		
Total	14		

*Significativo.

Cuadro A XXXVI. Análisis de varianza para el contenido de carotenoides totales en base seca del jugo, según el tratamiento aplicado.

Fuente de variación	Grados de libertad	Valor F	Probabilidad > F
Tratamiento	4	40,2159	< 0,0001*
Error	10		
Total	14		

*Significativo.

A.4 SÍNTESIS DE LOS ANÁLISIS DE REGRESIÓN MÚLTIPLE (ANÁLISIS DE VARIANZA) PARA LOS MODELOS GENERADOS EN LAS SUPERFICIES DE RESPUESTA (SECCIÓN 5.3)

Cuadro A XXXVII. Influencia de la concentración de preparado enzimático y del tiempo de incubación en el rendimiento de extracción, el pH y el contenido de sólidos solubles para jugo de zanahoria tratado enzimáticamente.

Número de prueba	Concentración de preparado enzimático (ppm)	Tiempo de incubación (min)	Rendimiento de extracción de jugo (% m/m)	pH	Sólidos solubles (°Brix)
1	-1	-1	67,3	4,82	9,8
2	-1	1	70,7	4,61	10,0
3	1	-1	73,8	4,56	10,0
4	1	1	75,7	4,36	11,0
5	$-\sqrt{2}$	0	67,8	4,66	9,5
6	$\sqrt{2}$	0	76,5	4,38	10,5
7	0	$-\sqrt{2}$	68,6	4,64	9,5
8	0	$\sqrt{2}$	76,5	4,37	10,7
Puntos centrales*	0	0	73,6±0,3	4,52±0,02	10,2±0,3
Rango de respuesta	-	-	67,3 - 76,5	4,36 - 4,82	9,5 - 11,0

*Datos reportados como promedio ± intervalo de confianza (n = 3) con un nivel de confianza del 95 %.

Cuadro A XXXVIII. Influencia de la concentración de preparado enzimático y del tiempo de incubación en el contenido de sólidos insolubles en suspensión, la turbidez y la luminosidad para jugo de zanahoria tratado enzimáticamente.

Número de prueba	Concentración de preparado enzimático** (ppm)	Tiempo de incubación** (min)	Sólidos insolubles en suspensión (% m/m)	Turbidez (NTU)	Color
					*L**
1	-1	-1	2,31	8943	52,42
2	-1	1	1,83	5017	47,41
3	1	-1	2,25	7673	51,03
4	1	1	1,89	5153	46,99
5	$-\sqrt{2}$	0	2,05	7730	51,54
6	$\sqrt{2}$	0	1,84	5220	49,00
7	0	$-\sqrt{2}$	2,39	8723	52,06
8	0	$\sqrt{2}$	1,67	4557	46,99
Puntos centrales†	0	0	1,86±0,06	5427±467	49,13± 0,07
Rango de respuesta	-	-	1,67 - 2,39	4557 - 8943	46,99 - 52,42

†Datos reportados como promedio ± intervalo de confianza (n = 3) con un nivel de confianza del 95 %.

Cuadro A XXXIX. Influencia de la concentración de preparado enzimático y del tiempo de incubación en el los parámetros de color *Chroma* y *Hue* para jugo de zanahoria tratado enzimáticamente.

Número de prueba	Concentración de preparado enzimático** (ppm)	Tiempo de incubación** (min)	Color	
			C*	***H°***
1	-1	-1	75,2	56,3
2	-1	1	68,0	55,0
3	1	-1	72,9	56,0
4	1	1	69,8	54,8
5	$-\sqrt{2}$	0	73,7	56,3
6	$\sqrt{2}$	0	69,6	56,8
7	0	$-\sqrt{2}$	75,4	57,2
8	0	$\sqrt{2}$	68,0	56,1
Puntos centrales[†]	0	0	70,1± 1,0	56,7± 0,9
Rango de respuesta	-	-	68,0 - 75,4	54,8 - 57,2

[†]Datos reportados como promedio ± intervalo de confianza (n = 3) con un nivel de confianza del 95 %.

Cuadro A XL. Influencia de la concentración de preparado enzimático y del tiempo de incubación en el contenido de sólidos totales y de carotenoides totales para jugo de zanahoria tratado enzimáticamente.

Número de prueba	Concentración de preparado enzimático** (ppm)	Tiempo de incubación** (min)	Sólidos totales (% m/m)	Carotenoides totales (µg β-caroteno/g muestra)	
				Base húmeda	Base seca
1	-1	-1	9,9	67	678
2	-1	1	10,2	42	417
3	1	-1	10,3	56	545
4	1	1	11,2	48	427
5	$-\sqrt{2}$	0	9,6	61	634
6	$\sqrt{2}$	0	10,1	45	448
7	0	$-\sqrt{2}$	9,5	68	710
8	0	$\sqrt{2}$	10,2	42	417
Puntos centrales*	0	0	10,0±0,3	46±3	456±18
Rango de respuesta	-	-	9,5 - 11,2	42 - 68	417 - 710

*Datos reportados como promedio ± intervalo de confianza (n = 3) con un nivel de confianza del 95 %.

Cuadro A XLI. Análisis de varianza para los modelos generados en las superficies de respuesta para el rendimiento de extracción de jugo, el pH y el contenido de sólidos solubles.

Respuesta	Fuentes de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Suma de cuadrados promedio	Valor-F (calculado)	p
Rendimiento de extracción de jugo (% m/m)	Regresión	109,359	4	27,3398	28,399	0,000486
	Residual	5,776	6	0,9627	-	-
	Falta de ajuste	5,588	4	1,3970	14,832	0,064159
	Error puro	0,188	2	0,0942	-	-
	Total	115,135	10	-	-	-
	R2 (%)	94,98				
	R2 ajustado (%)	91,64				
pH	Regresión	0,182	2	0,0909	43,793	0,000049
	Residual	0,017	8	0,0021	-	-
	Falta de ajuste	0,016	6	0,0027	8,196	0,112715
	Error puro	0,001	2	0,0003	-	-
	Total	0,198	10	-	-	-
	R2 (%)	91,63				
	R2 ajustado (%)	89,54				
Sólidos solubles (°Brix)	Regresión	1,824	2	0,9121	16,456	0,001462
	Residual	0,443	8	0,0554	-	-
	Falta de ajuste	0,277	6	0,0461	0,554	0,756876
	Error puro	0,167	2	0,0833	-	-
	Total	2,268	10	-	-	-
	R2 (%)	80,45				
	R2 ajustado (%)	75,56				

Valor-F $_{(4, 6, p = 0,05)}$ (tabulado) = 4,53. Valor-F $_{(4, 2, p = 0,05)}$ (tabulado) = 19,25. Valor-F $_{(2, 8, p = 0,05)}$ (tabulado) = 4,46. Valor-F $_{(6, 2, p = 0,05)}$ (tabulado) = 19,33.

Cuadro A XLII. Análisis de varianza para los modelos generados en las superficies de respuesta para el contenido de sólidos insolubles en suspensión, la turbidez y la luminosidad.

Respuesta		Fuentes de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Suma de cuadrados promedio	Valor-F (calcula-do)	p
Sólidos insolubles en suspensión (% m/m)		Regresión	0,500	3	0,1667	22,933	0,000537
		Residual	0,051	7	0,0073	-	-
		Falta de ajuste	0,045	5	0,0089	2,918	0,274689
		Error puro	0,006	2	0,0031	-	-
		Total	0,551	10	-	-	-
		R2 (%)	90,76				
		R2 ajustado (%)	86,81				
Turbidez (NTU)		Regresión	24944601,055	4	6236150,2636	22,779	0,000900
		Residual	1642586,824	6	273764,4707		
		Falta de ajuste	1301631,269	4	325407,8172	1,909	0,372058
		Error puro	340955,556	2	170477,7778		
		Total	26587187,879	10			
		R2 (%)	93,82				
		R2 ajustado (%)	89,70				
Color	*L**	Regresión	37,945	5	7,5891	30,799	0,000921
		Residual	1,232	5	0,2464	-	-
		Falta de ajuste	1,225	3	0,4084	117,252	0,008468
		Error puro	0,007	2	0,0035	-	-
		Total	39,177	10	-	-	-
		R^2 (%)	96,86				
		R^2 ajustado (%)	93,71				

Valor-F (3, 7, p = 0,05) (tabulado) = 4,35. Valor-F (5, 2, p = 0,05) (tabulado) = 19,30. Valor-F (4, 6, p = 0,05) (tabulado) = 4,53. Valor-F (4, 2, p = 0,05) (tabulado) = 19,25. Valor-F (5, 5, p = 0,05) (tabulado) = 5,05. Valor-F (3, 2, p = 0,05) (tabulado) = 19,16.

Cuadro A XLIII. Análisis de varianza para los modelos generados en las superficies de respuesta para el parámetro de color *Chroma* y el contenido de carotenoides totales.

Respuesta		**Fuentes de variación**	**Suma de cuadrados**	**Grados de libertad**	**Suma de cuadrados promedio**	**Valor-F (calcula-do)**	**P**
Color	*C**	Regresión	54,080	1	54,0797	25,350	0,000705
		Residual	19,200	9	2,1333		
		Falta de ajuste	17,676	7	2,5252	3,315	0,251234
		Error puro	1,523	2	0,7617		
		Total	73,279	10			
		R2 (%)	73,80				
		R2 ajustado (%)	70,89				
Carotenoides totales (µg β-caroteno/g muestra) (Base seca)		Regresión	116195,430	5	23239,0860	20,586	0,002386
		Residual	5644,275	5	1128,8550	-	-
		Falta de ajuste	5125,659	3	1708,5530	6,589	0,134609
		Error puro	518,616	2	259,3078	-	-
		Total	121839,705	10	-	-	-
		R2 (%)	95,37				
		R2 ajustado (%)	90,74				

Valor-F $_{(5, 5, p = 0,05)}$ (tabulado) = 5,05. Valor-F $_{(3, 2, p = 0,05)}$ (tabulado) = 19,16.Valor-F $_{(1, 9, p = 0,05)}$ (tabulado) = 5,12. Valor-F $_{(7, 2, p = 0,05)}$ (tabulado) = 19,35.

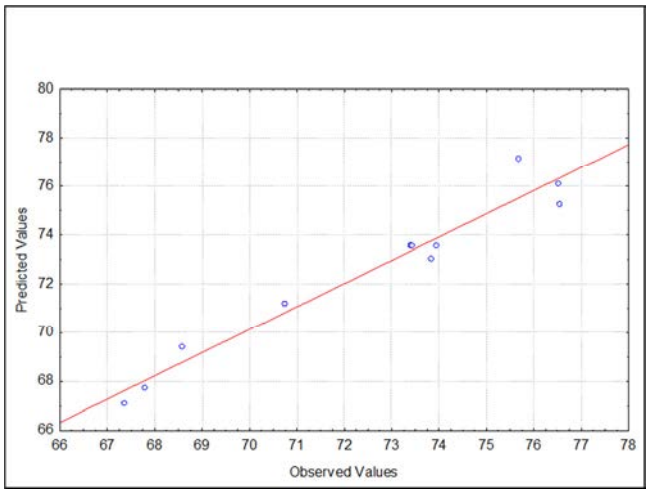

Figura A 1. Gráfica de residuos (valores predichos versus valores observados) del modelo generado para el rendimiento de extracción de jugo de zanahoria.

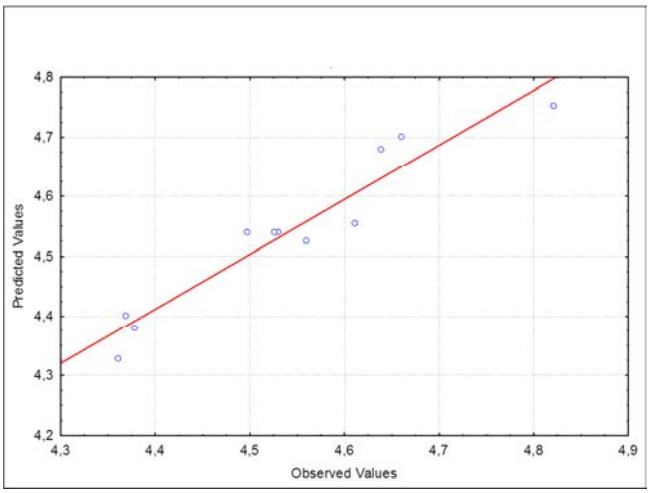

Figura A 2. Gráfica de residuos (valores predichos versus valores observados) del modelo generado para el pH de jugo de zanahoria.

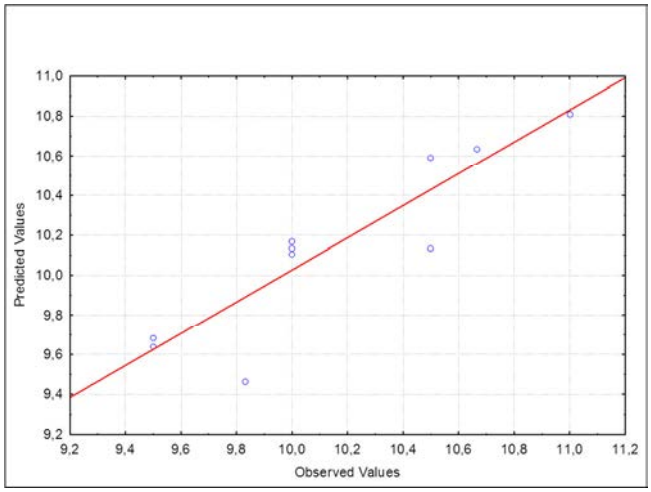

Figura A 3. Gráfica de residuos (valores predichos versus valores observados) del modelo generado para el contenido de sólidos solubles (°Brix) de jugo de zanahoria.

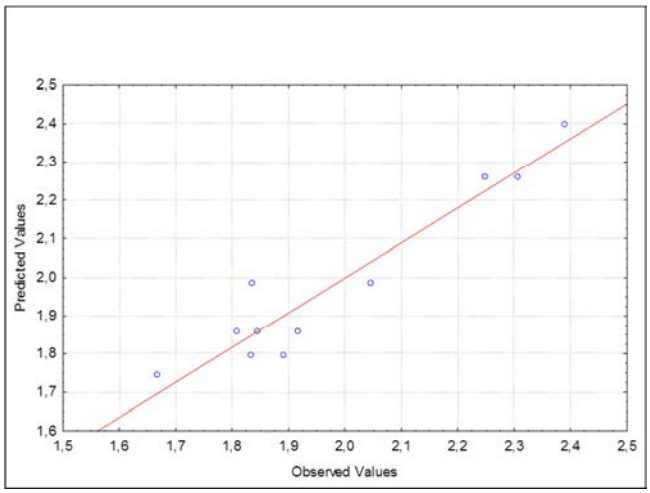

Figura A 4. Gráfica de residuos (valores predichos versus valores observados) del modelo generado para el contenido de sólidos insolubles en suspensión de jugo de zanahoria.

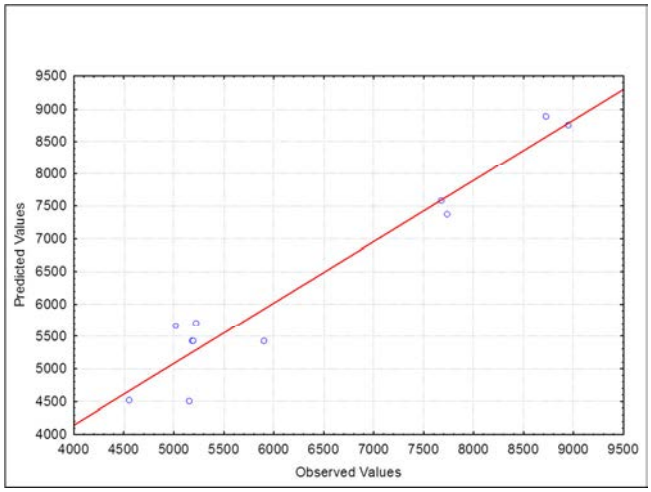

Figura A 5. Gráfica de residuos (valores predichos versus valores observados) del modelo generado para la turbidez de jugo de zanahoria.

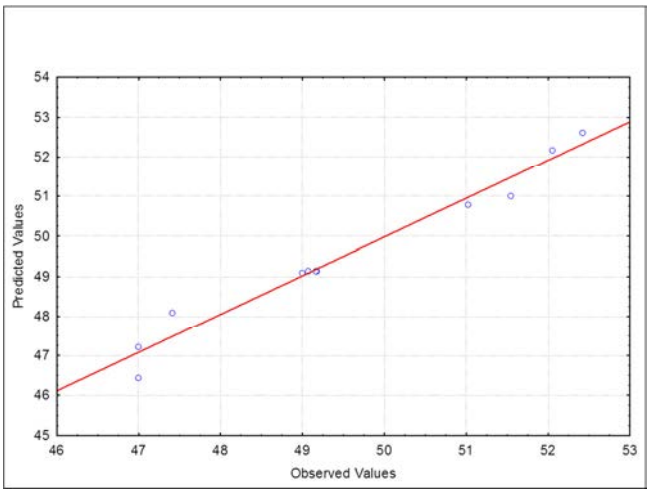

Figura A 6. Gráfica de residuos (valores predichos versus valores observados) del modelo generado para la luminosidad (*L**) de jugo de zanahoria.

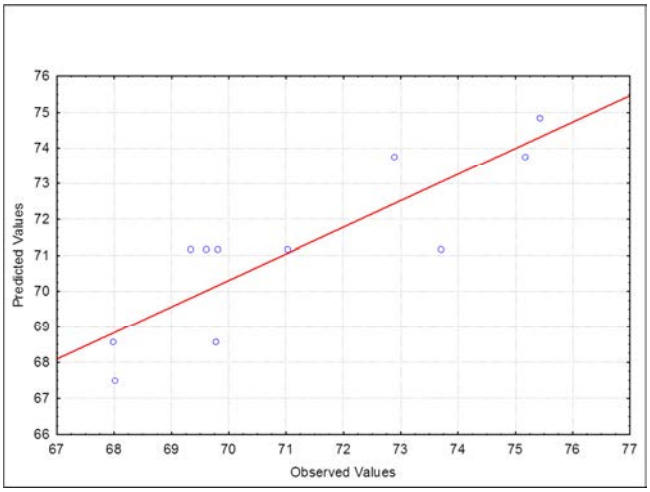

Figura A 7. Gráfica de residuos (valores predichos versus valores observados) del modelo generado para el *Chroma* (*C**) de jugo de zanahoria.

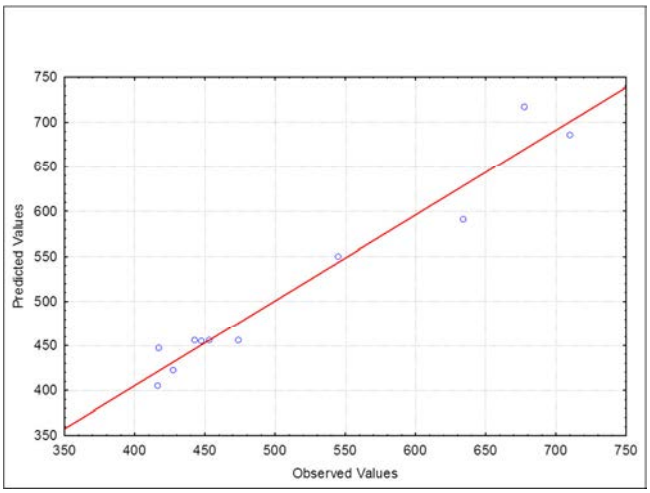

Figura A 8. Gráfica de residuos (valores predichos versus valores observados) del modelo generado para el contenido de carotenoides totales (en base seca) de jugo de zanahoria.

A.5 ANÁLISIS DE VARIANZA (ANDEVA) PARA LOS RESULTADOS DE COMPARACIÓN DEL RENDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE JUGO DE ZANAHORIA A NIVEL DE LABORATORIO A DOS TEMPERATURAS DE TRATAMIENTO ENZIMÁTICO (SECCIÓN 5.4)

Cuadro A XLIV. Análisis de varianza para el rendimiento de extracción de jugo, según el tratamiento aplicado.

Fuente de variación	Grados de libertad	Valor F	Probabilidad > F
Tratamiento	2	186,5149	< 0,0001*
Error	6		
Total	8		

*Significativo.

Cuadro A XLV. Análisis de varianza para el pH del jugo, según el tratamiento aplicado.

Fuente de variación	Grados de libertad	Valor F	Probabilidad > F
Tratamiento	2	70,0404	< 0,0001*
Error	6		
Total	8		

*Significativo.

Cuadro A XLVI. Análisis de varianza para el contenido de sólidos solubles (°Brix) del jugo, según el tratamiento aplicado.

Fuente de variación	Grados de libertad	Valor F	Probabilidad > F
Tratamiento	2	46,3875	0,0002*
Error	6		
Total	8		

*Significativo.

Cuadro A XLVII. Análisis de varianza para el contenido de sólidos insolubles en suspensión del jugo, según el tratamiento aplicado.

Fuente de variación	Grados de libertad	Valor F	Probabilidad > F
Tratamiento	2	100,1167	< 0,0001*
Error	6		
Total	8		

*Significativo.

Cuadro A XLVIII. Análisis de varianza para la turbidez del jugo, según el tratamiento aplicado.

Fuente de variación	Grados de libertad	Valor F	Probabilidad > F
Tratamiento	2	224,6087	< 0,0001*
Error	6		
Total	8		

*Significativo.

Cuadro A XLIX. Análisis de varianza para la luminosidad (L^*) del jugo, según el tratamiento aplicado.

Fuente de variación	Grados de libertad	Valor F	Probabilidad > F
Tratamiento	2	361,1274	< 0,0001†
Error	6		
Total	8		

†Significativo.

Cuadro A L. Análisis de varianza para el *Chroma* (*C**) del jugo, según el tratamiento aplicado.

Fuente de variación	Grados de libertad	Valor F	Probabilidad > F
Tratamiento	2	394,0162	< 0,0001†
Error	6		
Total	8		

†Significativo.

Cuadro A LI. Análisis de varianza para el *Hue* (*H°*) del jugo, según el tratamiento aplicado.

Fuente de variación	Grados de libertad	Valor F	Probabilidad > F
Tratamiento	2	139,7164	< 0,0001*
Error	6		
Total	8		

*Significativo.

Cuadro A LII. Análisis de varianza para el contenido de sólidos totales del jugo, según el tratamiento aplicado.

Fuente de variación	Grados de libertad	Valor F	Probabilidad > F
Tratamiento	2	21,5580	0,0166*
Error	6		
Total	8		

*Significativo.

Cuadro A LIII. Análisis de varianza para el contenido de carotenoides totales del jugo, según el tratamiento aplicado.

Fuente de variación	Grados de libertad	Valor F	Probabilidad > F
Tratamiento	2	1212,867	< 0,0001*
Error	6		
Total	8		

*Significativo.

Cuadro A LIV. Análisis de varianza para el contenido de carotenoides totales en base seca del jugo, según el tratamiento aplicado.

Fuente de variación	Grados de libertad	Valor F	Probabilidad > F
Tratamiento	2	470,6966	0,0002*
Error	6		
Total	8		

*Significativo.

A.6 PRUEBA t DE STUDENT Y ANÁLISIS DE VARIANZA (ANDEVA) PARA LOS RESULTADOS DE IMPLEMENTACIÓN DEL PROCESO QUE INVOLUCRA EL TRATAMINETO ENZIMÁTICO ÓPTIMO A NIVEL DE PLANTA PILOTO Y INDUSTRIAL (SECCIÓN 5.5)

Cuadro A LV. Prueba t de Student para el rendimiento de extracción de jugo a nivel de planta piloto y de laboratorio.

	Diferencia	Prueba t	Grados de libertad	Probabilidad > |t|
Estimado	-6,957	-4,448	4	0,0113*
Error estándar	1,564			

*Significativo.

Cuadro A LVI. Prueba t de Student para el rendimiento de extracción de jugo a nivel industrial, según el tratamiento aplicado.

	Diferencia	Prueba t	Grados de libertad	Probabilidad > |t|
Estimado	16,3800	5,893	4	0,0041*
Error estándar	2,7797			

*Significativo.

Cuadro A LVII. Análisis de varianza para el pH, según el tratamiento aplicado.

Fuente de variación	Grados de libertad	Valor F	Probabilidad > F
Tratamiento	2	170,5069	< 0,0001*
Error	6		
Total	8		

*Significativo.

Cuadro A LVIII. Análisis de varianza para el contenido de sólidos solubles (°Brix), según el tratamiento aplicado.

Fuente de variación	Grados de libertad	Valor F	Probabilidad > F
Tratamiento	2	3,4490	0,1007
Error	6		
Total	8		

Cuadro A LIX. Prueba t de Student para el contenido de sólidos insolubles en suspensión del jugo, según el tratamiento aplicado.

	Diferencia	Prueba t	Grados de libertad	Probabilidad > |t|
Estimado	-11,908	-2,832	4	0,0472*
Error estándar	4,205			

*Significativo.

Cuadro A LX. Prueba t de Student para la turbidez del jugo, según el tratamiento aplicado.

	Diferencia	Prueba t	Grados de libertad	Probabilidad > |t|
Estimado	-4012,0	-30373	4	0,0280*
Error estándar	1189,3			

*Significativo.

Cuadro A LXI. Análisis de varianza para la luminosidad (L^*), según el tratamiento aplicado.

Fuente de variación	Grados de libertad	Valor F	Probabilidad > F
Tratamiento	2	3,3752	0,1042
Error	6		
Total	8		

Cuadro A LXII. Análisis de varianza para el *Chroma* (C^*), según el tratamiento aplicado.

Fuente de variación	Grados de libertad	Valor F	Probabilidad > F
Tratamiento	2	2,4124	0,1703
Error	6		
Total	8		

Cuadro A LXIII. Análisis de varianza para el *Hue* ($H°$), según el tratamiento aplicado.

Fuente de variación	Grados de libertad	Valor F	Probabilidad > F
Tratamiento	2	28,9957	0,0008*
Error	6		
Total	8		

*Significativo.

Cuadro A LXIV. Análisis de varianza para el contenido de sólidos totales, según el tratamiento aplicado.

Fuente de variación	Grados de libertad	Valor F	Probabilidad > F
Tratamiento	2	6,8560	0,0282*
Error	6		
Total	8		

*Significativo.

Cuadro A LXV. Análisis de varianza para el contenido de carotenoides totales, según el tratamiento aplicado.

Fuente de variación	Grados de libertad	Valor F	Probabilidad > F
Tratamiento	2	21,2201	0,0019*
Error	6		
Total	8		

*Significativo.

Cuadro A LXVI. Análisis de varianza para el contenido de carotenoides totales en base seca, según el tratamiento aplicado.

Fuente de variación	Grados de libertad	Valor F	Probabilidad > F
Tratamiento	2	11,6585	0,0086*
Error	6		
Total	8		

*Significativo.

Cuadro A LXVII. Prueba t de Student para estabilidad relativa a la turbidez del jugo, según el tratamiento aplicado.

	Diferencia	Prueba t	Grados de libertad	Probabilidad > |t|
Estimado	7,1367	5,573	4	0,0051*
Error estándar	1,2806			

*Significativo.

A.7 LEGISLACIÓN Y NORMATIVA DE ESPECIAL INTERÉS

Legislación

Ley para la gestión integral de residuos, No. 8839

La ley para la gestión integral de residuos responsabiliza a todas las personas físicas y jurídicas generadoras de residuos de toda clase, salvo a las que se regulan por una legislación especial, a realizar un manejo integral y sostenible de los mismos.

Tiene entre sus objetivos promover un ambiente ecológicamente equilibrado, fomentar el desarrollo de mercados de subproductos y materiales valorizables, promover el desarrollo y la utilización de innovaciones y transferencias tecnológicas para la gestión integral de residuos y promover el enfoque preventivo en la toma de decisiones por parte de los actores.

Establece que prioritariamente la generación de residuos debe ser evitada en su origen o en su defecto, reducida al máximo. Señala además, que los residuos generados deben ser reutilizados o valorizados, y si esto no es posible, deben ser debidamente tratados y dispuestos.

Se encuentra vigente desde el 13 de julio del 2010 y actualmente rige la versión 2, del 8 de agosto del 2010.

RTCR 390: 2005 Jugos y néctares de frutas, N° 32916

El reglamento describe las características generales que deben cumplir los jugos y néctares de frutas preenvasados, destinados al consumo humano que se comercializan en Costa Rica. Permite el uso de preparados enzimáticos, pectinasas, proteasas, amilasas y celulasas como coadyuvantes de elaboración.

Se encuentra vigente desde el 10 de marzo del 2006 y actualmente rige la versión 1, del 10 de octubre del 2005.

RTCR 100: 1997 Etiquetado de los alimentos preenvasados, N° 26012
El reglamento aplica al etiquetado de todos los alimentos preenvasados que se ofrecen como tales al consumidor o para fines de hotelería, y a algunos aspectos relacionados con la presentación de los mismos.

Se define un coadyuvante para la elaboración como: "toda sustancia o materia extraña, excluidos aparatos y utensilios, que no se consume como ingrediente alimenticio por sí mismo, y que se emplea intencionadamente en la elaboración de materias primas, alimentos o sus ingredientes, para lograr alguna finalidad tecnológica durante el tratamiento o la elaboración pudiendo dar lugar a la presencia no intencionada, pero inevitable, de residuos o derivados en el producto final".

Establece que las enzimas como coadyuvantes de elaboración, estarán exentos de la declaración en la lista de ingredientes.

Se encuentra en vigente desde el de junio de 1997 y actualmente rige la versión 6, del 17 de marzo del 2009.

Normativa
Los siguientes lineamientos no establecen responsabilidades legales forzosas, por lo tanto deben ser vistos como recomendaciones.

Norma general del Codex para zumos (jugos) y néctares de frutas, Codex Stan 247-2005

Norma general del Codex para el etiquetado de los alimentos preenvasados, Codex Stan 1-1985

Directrices para sustancias utilizadas como coadyuvantes de elaboración, CAC/GL 75-2010
La norma tiene como objetivo proporcionar información para el uso inocuo de las sustancias que se utilizan como coadyuvantes de elaboración y la inocuidad de sus residuos en la preparación de alimentos y de ingredientes de alimentos.