

**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGROALIMENTARIAS**  
**ESCUELA DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

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

**“Estudio del proceso de elaboración de jugo clarificado de mora mediante microfiltración acoplado a un tratamiento enzimático en una empresa procesadora de frutas y vegetales”**

**Federico Cantillo Calvo**

**A41120**

**Ciudad Universitaria Rodrigo Facio**

**San José, Costa Rica**

**Junio, 2014**

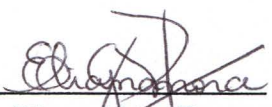
## **DERECHOS DE PROPIEDAD INTELECTUAL**


La confidencialidad de este trabajo de graduación es de carácter parcial dado que los resultados generados pueden ser objeto de una transferencia tecnológica.


**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.

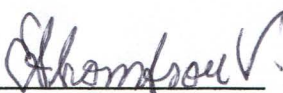
Aprobado por:

  
\_\_\_\_\_  
Lic. Eliana Mora Peraza  
Presidente del Tribunal

  
\_\_\_\_\_  
Lic. Manuel Montero Barrantes  
Director del Proyecto

  
\_\_\_\_\_  
Ph.D. Ana Mercedes Pérez Carvajal  
Profesora Asesora

  
\_\_\_\_\_  
M.Sc. Marvin Soto Retana  
Profesor Asesor

  
\_\_\_\_\_  
Lic. Eduardo Thompson Vicente  
Profesor Designado

## DEDICATORIA

*Este trabajo fue hecho para Dios  
y para todas las personas que amo y aprecio.*

*Para Tata, nunca te olvidaremos.*

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA), a la Escuela de Ingeniería de Alimentos y al proyecto “Aplicación de tecnologías innovadoras para contribuir con el desarrollo sostenible del cultivo de higo (*Ficus carica*) y mora (*Rubus* spp.) en Costa Rica” no.801-B1-655, por brindar las instalaciones y el financiamiento para la elaboración de este trabajo.

A la Doctora Ana Mercedes por presentarme el proyecto en primer lugar y junto a Manuel Montero y Marvin Soto, por ser mi comité asesor, no puedo pensar en mejor equipo, gracias por todo el apoyo a todas horas.

A Diego y Valeria por ayudarme en esos eternos ensayos de 5 horas seguidas con la mejor de las voluntades y el ánimo al tope, a Mariela por los ratos de extracción de jugo de mora, a Camacho por toda la ayuda, nos quedó faltando un partida de ajedrez, a Cata por gastar un día conmigo de laboratorio viendo cómo se hacían las pruebas.

Al personal del laboratorio de Química de la Escuela por su inmejorable disposición a ayudar durante todo el proceso.

A mis compañeros de senda, Manuel, Greivin, Jose, Tebi, Abea y Nacho, por compartir quejas y hacerme entender que todos tenemos problemas, y que todo tiene solución. A mis papás por ponerme atención, animarme y apoyar en todo este proceso, a mi hermana por regañarme elocuentemente cada vez que perdía el tiempo.

Una mención especial a don Álvaro Sequeira por las palabras más sabias que me han dicho durante esta tesis.

## Índice general

DERECHOS DE PROPIEDAD INTELECTUAL.....	ii
TRIBUNAL EXAMINADOR .....	iii
DEDICATORIA .....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
Nomenclatura .....	xiii
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 mora.....	7
3.1.1 Descripción del fruto.....	7
3.1.2 Compuestos antioxidantes presentes en la mora .....	7
3.1.3 Producción de la mora en Costa Rica.....	10
3.2 Jugos clarificados de frutas .....	11
3.3 Metodologías de extracción de jugos de frutas .....	12
3.3.1 Generalidades .....	12
3.3.2 Despulpado .....	13
3.3.3 Prensado .....	13
3.3.4 Tratamientos enzimáticos .....	15
3.4 Tecnología de membranas .....	16
3.4.1 Generalidades .....	16
3.4.2 Microfiltración tangencial .....	18
3.5 Metodología de la superficie de respuesta.....	25
IV. MATERIALES Y MÉTODOS .....	26
4.1 Localización del proyecto.....	26
4.2 Materia prima.....	26
4.3 Preparados enzimáticos .....	26
4.4 Pruebas preliminares.....	27
4.4.1 Caracterización del proceso y del jugo elaborado en la empresa .....	27
4.4.2 Elaboración del jugo pulposo en la planta piloto del CITA .....	28
4.4.3 Pruebas preliminares para la optimización del tratamiento enzimático del jugo pulposo de mora .....	30

4.5	Pruebas definitivas .....	31
4.5.1	Selección del preparado enzimático .....	31
4.5.2	Optimización del tratamiento enzimático (tiempo y concentración del preparado enzimático) para dos tipos de jugo de mora.....	32
4.5.3	Determinación del proceso de obtención de jugo de mora más adecuado para alcanzar los flujos y rendimientos más altos en la microfiltración tangencial (MFT) a nivel piloto .....	33
4.5.4	Corroboración de la factibilidad técnica del proceso mediante ensayos de MFT de larga duración a escala piloto. ....	36
4.6	Análisis estadístico .....	36
4.7	Métodos de Análisis.....	37
4.7.1	Determinación del porcentaje de sólidos insolubles en suspensión (SIS) ...	37
4.7.2	Determinación de la turbidez .....	38
4.7.3	Determinación de la viscosidad utilizando el viscosímetro de Ostwald .....	38
4.7.4	Medición de la viscosidad utilizando un viscosímetro rotacional .....	39
4.7.5	Determinación de los sólidos solubles (°Brix) .....	39
4.7.6	Determinación del pH .....	39
4.7.7	Determinación del rendimiento de extracción a nivel de laboratorio.....	39
4.7.8	Determinación de color.....	40
4.7.9	Rendimiento de las operaciones.....	40
4.7.10	Costos económicos .....	41
V.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	44
5.1	Pruebas preliminares.....	44
5.1.1	Caracterización del proceso y del jugo realizado en la empresa.....	44
5.1.2	Elaboración del jugo pulposo en la planta piloto del CITA .....	48
5.1.3	Pruebas preliminares para la optimización del tratamiento enzimático del jugo pulposo de mora .....	51
5.2	Pruebas definitivas .....	53
5.2.1	Selección del preparado enzimático .....	53
5.2.2	Optimización del tratamiento enzimático (tiempo y concentración del preparado enzimático) para dos tipos de jugo de mora.....	55
5.2.3	Determinación del proceso de obtención de jugo de mora más adecuado para alcanzar los flujos y rendimientos más altos en la microfiltración tangencial (MFT) a nivel piloto.....	63
5.2.4	Evaluación de la factibilidad técnica del proceso mediante ensayos de MFT de larga duración a escala piloto. ....	69
VI.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	75
6.1	Conclusiones .....	75
6.2	Recomendaciones.....	76

VII.	BIBLIOGRAFÍA .....	77
VIII.	Anexos .....	87
8.1	Características de los enzimáticos utilizados .....	87
8.2	ANDEVA para los resultados de la caracterización del proceso en la empresa .	87
8.3	ANDEVA para los distintos métodos de extracción en la planta piloto del CITA.	89
8.4	ANDEVA para los parámetros evaluados durante la selección del preparado enzimático óptimo.....	90
8.5	ANDEVA para las prueba preliminar para la Optimización las condiciones del tratamiento enzimático (tiempo y concentración del preparado enzimático) utilizando el preparado preseleccionado, para dos tipos de jugo de mora .....	91
8.6	Resultados de las variables respuesta para cada una de las superficies de respuesta con jugo pulposo y jugo prensado.....	93
8.7	Graficas de residuos para cada una de las variables respuesta par a las superficies de respuesta con jugo pulposo y jugo prensado.....	94
8.8	Prueba t para la corroboración de resultados de la superficie de respuesta de jugo prensado .....	96
8.9	ANDEVA para los flujos de permeado según el tipo de procesamiento de los 15 a los 45 y a varios rangos de FRV.....	96
8.10	Características de los jugos en distintas etapas del proceso durante los ensayos de larga duración de MFT de jugo de mora. ....	97
8.11	ANDEVAS para características de las muestra obtenidas durante los ensayos de larga duración de MFT de jugo de mora.....	97
8.12	Procedimiento de la limpieza membrana de cerámica .....	99



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Hidroprensa para el prensado de manera discontinua de mora .....	14
<b>Figura 2.</b> Hidroprensa para el prensado de manera discontinua de 40 L Carezza .....	14
<b>Figura 3.</b> Acción de los distintos tipos de enzimas en un preparado comercial .....	16
<b>Figura 4.</b> Tecnologías de membrana basadas en presión y sus características de separación .....	17
<b>Figura 5.</b> Representación esquemática del flujo de alimentación perpendicular y tangencia.....	19
<b>Figura 6.</b> Diagrama del elemento de membrana .....	20
<b>Figura 7.</b> Mecanismos de bloqueo de una membrana .....	22
<b>Figura 8.</b> Metodología del procesamiento de jugo microfiltrado de mora utilizada en la empresa procesadora de frutas y vegetales .....	27
<b>Figura 9.</b> Metodologías de extracción de jugo de mora .....	29
<b>Figura 10.</b> Hidroprensa de la marca Enoctecnica Pillan, modelo Carezza .....	29
<b>Figura 11.</b> Metodologías de procesamiento para producción de jugo microfiltrado de mora .....	34
<b>Figura 12.</b> Diagrama del equipo de MFT piloto utilizado.....	35
<b>Figura 13.</b> Viscosímetro de Ostwald.....	38
<b>Figura 14.</b> Flujo de permeado y FRV durante la microfiltración.....	46
<b>Figura 15.</b> Flujo de proceso a utilizar para la obtención de jugo de mora con un 23,6 % de sólidos insolubles en suspensión.....	50
<b>Figura 16.</b> Evolución de la viscosidad del jugo prensado de mora en función de la concentración de enzima y el tiempo de incubación a Y °C.....	60
<b>Figura 17.</b> Evolución del flujo de permeado y del valor FRV para jugo de mora con tres tipos diferentes de procesos de obtención .....	64

**Figura 18.** Flujos de permeado a diferentes valores promedio de FRV para jugos obtenidos mediante distintos procesos de extracción ..... 67

**Figura 19.** Flujo de permeado en función del valor de FRV para tres metodologías de procesamiento de jugo de mora..... 67

**Figura 20.** Evolución del flujo de permeado y del FRV durante la MFT de jugo prensado de mora con un tratamiento enzimático previo con el preprado enzimático A ..... 70

**Figura 21.** Flujo de proceso definitivo para la obtención de jugo microfiltrado de mora.... 74

## INDICE DE CUADROS

<b>Cuadro I.</b> Variables y niveles a utilizar en el diseño central compuesto.....	30
<b>Cuadro II.</b> Variables y niveles a utilizar en el diseño central compuesto.....	32
<b>Cuadro III.</b> Matriz del diseño central compuesto de dos factores y cinco niveles (puntos aleatorizados).....	33
<b>Cuadro IV.</b> Supuestos y costos para análisis económico de cada uno de los procesos de obtención de jugo clarificado de mora estudiados.....	42
<b>Cuadro V.</b> Turbidez, sólidos insolubles en suspensión (SIS), sólidos solubles y color de los jugos obtenidos en diferentes etapas del procesamiento de jugo microfiltrado de mora en la empresa. ....	44
<b>Cuadro VI.</b> Rendimiento de las operaciones individuales y el global del proceso de extracción y microfiltración de jugo de mora en la empresa. ....	47
<b>Cuadro VII.</b> Porcentaje de rendimiento y sólidos en suspensión de jugos de mora obtenidos mediante varios métodos de extracción.....	48
<b>Cuadro VIII.</b> Valores de viscosidad y turbidez obtenidos para las muestras de jugo de mora prensado con hidroprensa con distintos tratamientos enzimáticos utilizando el preparado enzimático (A), a una temperatura de Y °C. ....	51
<b>Cuadro IX.</b> Valores de viscosidad, turbidez, rendimiento a nivel de laboratorio y porcentaje de sólidos insolubles en suspensión de jugos de mora con un 23,64 % SIS con distintos tratamientos enzimáticos utilizando el preparado (A), a Y °C. ....	52
<b>Cuadro X.</b> Parámetros evaluados para la determinación del preparado enzimático más promisorio para llevar a cabo el tratamiento enzimático de jugo pulposo de mora a una concentración de X ppm y a Y °C.....	53
<b>Cuadro XI.</b> Efecto del tiempo de incubación y la concentración de enzima sobre la viscosidad y la turbidez de un jugo pulposo de mora con un 23,64 % de SIS y un jugo de mora prensado con hidroprensa, a un temperatura de Y °C.....	56
<b>Cuadro XII.</b> Coeficientes de determinación ( $R^2$ ) y valores de probabilidad de los modelos generados para las dos variables dependientes durante el tratamiento enzimático de jugo pulposo de mora con un 23,6 % de sólidos insolubles en suspensión.....	57

<b>Cuadro XIII.</b> Coeficientes de determinación, $R^2$ y valores de probabilidad para las dos variables dependientes para el tratamiento enzimático de jugo de mora prensado con menos del 1% de sólidos insolubles en suspensión.....	59
<b>Cuadro XIV.</b> Valor experimental de respuesta en las condiciones óptimas.....	62
<b>Cuadro XV.</b> Flujos promedio de permeado para un tiempo comprendido entre 15 min a 45 min de microfiltración tangencial a una temperatura de Y °C y a una presión transmembranaria promedio de W bar. ....	65
<b>Cuadro XVI.</b> Flujo de permeado, producción diaria, costo y aporte de la materia prima, para los procesos estudiados de obtención de jugo microfiltrado de mora a varios valores de FRV. ....	68
<b>Cuadro XVII.</b> Viscosidad, turbidez, sólidos solubles y pH del jugo inicial para las dos repeticiones de los ensayos de larga duración de MFT de jugo de mora.....	71
<b>Cuadro XVIII.</b> Flujos de permeado y valores de FRV reportados para la microfiltración de distintas frutas.....	72

## Nomenclatura

**ANDEVA**, Análisis de Varianza

**AOAC**, *Association of Official Analytical Chemists*

**APROCAM**, Asociación de Productores y Exportadores de Mora y Frutales de Altura

**CITA**, Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos

**CNP**, Consejo Nacional de la Producción

**CODEX**, Codex Alimentarius

**FRV**, Factor de reducción volumétrico

**GAE**, Equivalentes de Ácido Gálico

**H-ORAC**, *Hydrophilic-oxygen radical antioxidant capacity*

**J**, Flujo de permeado

**MFT**, Microfiltración tangencial

**m.s.n.m**, metros sobre el nivel del mar

**MSR**, Metodología de Superficie de Respuesta

**V<sub>p</sub>**, Volumen de permeado

**VIH**, Virus de la inmunodeficiencia humana

**NTU**, *Nephelometric turbidity units*

**NM**, no se midió

**PCE**, Jugo Prensado con Tratamiento enzimático

**PSE**, Jugo Prensado sin Tratamiento enzimático

**PTM**, Presión transmembranaria

**P<sub>ent</sub>**, Presión de entrada

**P<sub>sal</sub>**, Presión de salida del retenido

**P<sub>er</sub>**, Presión de salida del permeado

**ppm**, partes por millón

**R<sub>t</sub>**, Resistencia total

**SIS**, sólidos insolubles en suspensión

**UFC**, Unidades formadoras de colonias

**μ**, viscosidad

**V<sub>a</sub>**, Volumen alimentado

**V<sub>r</sub>**, Volumen de retenido

**TE**, Tratamiento Enzimático

## Resumen

Se optimizó el proceso de producción de jugo microfiltrado de mora, mediante la comparación de varios métodos de extracción con respecto al que se utilizaba en la empresa procesadora de frutas y vegetales. Además se efectuó la selección del mejor preparado enzimático disponible en el mercado y se llevó a cabo la optimización del proceso de maceración, con el fin de obtener mejores flujos de permeado y un mayor rendimiento en la operación de microfiltración tangencial (MFT).

Preliminarmente se desarrolló, a nivel de planta piloto, el proceso para obtener un jugo pulposo similar al que se produce en la empresa para ser utilizado en las pruebas definitivas. No se encontró diferencia significativa en la efectividad de extracción de jugo al utilizar varios preparados enzimáticos comerciales, por lo que se seleccionó el preparado más económico para realizar las siguientes pruebas. Se hicieron dos optimizaciones (variables tiempo y concentración), una para el jugo pulposo (similar al de la empresa) y otra para el jugo extraído en la hidroprensa (con un bajo contenido de pulpa). En el jugo pulposo el modelo generado no fue estadísticamente significativo en el rango evaluado. Para el jugo extraído con la hidroprensa el modelo fue significativo para la variable respuesta de viscosidad, obteniendo el valor óptimo con un tiempo de  $T_{-1/2}$  min y una concentración de  $C_0$  ppm.

Luego se comparó el efecto sobre la productividad, medida como rendimiento y flujo de permeado, de la MFT (en modo de concentración de retenido) de tres procesos de producción de jugo de mora. En el primero se utilizó jugo pulposo similar al producido en la empresa, acoplado al tratamiento enzimático ya definido, en el segundo se utilizó jugo extraído con la hidroprensa y en el tercero se utilizó jugo extraído con la hidroprensa acoplado al tratamiento enzimático definido anteriormente. Este último proceso fue el más productivo y se utilizó en los ensayos de larga duración (en modo de concentración-extracción).

Mediante la realización de ensayos de MFT de 5 horas, con el fin de determinar si era posible mantener la productividad observada en modo de concentración de retenido durante una jornada de 8 horas de trabajo. Se recirculó el permeado por el sistema para simular las condiciones de alimentación-extracción de una producción continua. En los ensayos se obtuvieron flujos altos, con un flujo de permeado promedio de  $146,20\text{L/hm}^2$ , lo cual hace que el proceso se considere promisorio para su estudio a nivel industrial.

## I. JUSTIFICACIÓN

Existe el interés cada vez mayor por parte del público en el cuidado de la salud, la prevención de las enfermedades degenerativas y en retardar de manera general el proceso de envejecimiento, por lo que la demanda en lo que se refiere a la producción de alimentos ha cambiado (Siró *et al.*, 2008). Se cambió de tener un enfoque de supervivencia pasando por la satisfacción del impulso de comer y la seguridad alimentaria, al enfoque actual en el que los alimentos promuevan la salud mediante la mejora del bienestar del individuo y la prevención de enfermedades (Diplock, 1999; Roberfroid, 2000). Existen varias razones para este cambio, entre ellas, el aumento en los costos médicos y los días laborales que se pierden por enfermedades, el aumento en la expectativa de vida, el envejecimiento de la población y el deseo de tener una mejor calidad de vida (Diplock, 1999; Roberfroid, 2000).

Con el tiempo se ha desarrollado el término alimento funcional, que abarca una gran cantidad de tipos de productos, ya que una importante variedad de alimentos son y serán caracterizados como funcionales. Aunque no exista aún una definición para alimento funcional, sí se tiene un consenso sobre las características que debe tener un alimento para incluirse en este grupo, como por ejemplo ser un alimento convencional, ser consumido en una dieta normal, que sus componentes sean generados naturalmente, no de manera sintética o suplementada, tener un efecto positivo en una función específica más allá de su valor nutricional, mejorar el bienestar de una persona o reducir el riesgo de alguna enfermedad y tener declaraciones científicas autorizadas (Roberfroid, 2000).

Es importante conocer la base sobre la cual funcionan algunos alimentos funcionales, como por ejemplo prevenir enfermedades y retardar el proceso de envejecimiento. Meydani (2000) menciona la base de la teoría actual del envejecimiento, que consiste en la teoría de los radicales libres, la cual es un cambio dependiente del tiempo en el equilibrio de oxidantes versus antioxidantes, lo cual lleva al estrés oxidativo, la descompensación del equilibrio celular y al proceso de envejecimiento visto como cambios fenotípicos y del deterioro funcional. Esto ha generado gran interés sobre la manera en la que la alimentación puede regular este proceso, y se han investigado varios componentes de los alimentos, uno de los cuales son las sustancias antioxidantes.

El término antioxidante abarca a una gran cantidad de sustancias, y se menciona a las frutas y vegetales como una fuente de estos (Wootton-Beard & Ryan, 2011); y a su vez,

mediante evidencia epidemiológica se ha logrado establecer una correlación inversa entre el consumo de frutas y vegetales con respecto a la ocurrencia de enfermedades inflamatorias, cardiovasculares, ciertos tipos de cáncer y otras relacionadas con el envejecimiento (Hung *et al.*, 2004; Anlasik *et al.*, 2005; Acosta-Montoya *et al.*, 2010), y se piensa que esto se debe a la alta cantidad de sustancias antioxidantes que contienen estos productos de origen vegetal, al menos así se ha demostrado mediante estudios *in vitro* (Wootton-Beard & Ryan, 2011).

Entre las frutas con una mayor cantidad de compuestos antioxidantes se encuentra la mora de la variedad vino (*R. adenotrichos*); Mertz *et al.* (2007) demostraron que la mora de esta variedad de *Rubus* tiene como principales compuestos fenólicos a los elagitaninos, y a su vez Acosta-Montoya *et al.* (2010) obtuvieron cantidades de compuestos antioxidantes mayores a las variedades que se cultivan en climas más templados, y una capacidad antioxidante comparable a la que tienen los arándanos. Estas características hacen que la mora sea un producto especial con una ventaja comercial.

A nivel mundial la producción de mora ha aumentado en algunas regiones del mundo, principalmente en países de Europa del este, Chile, México y China. Las zonas de mayor producción son Norte América y Europa del Este, y para el 2005 la producción mundial era de alrededor 155 mil toneladas (Strik *et al.*, 2007). En Costa Rica, específicamente la producción de mora se concentra en las zonas sobre los 1500 m.s.n.m, la zona de los Santos (Tarrazú, Dota y León Cortés), El Guarco y las partes altas de Pérez Zeledón (Castro & Cerdas, 2005).

El área de cosecha de mora en Costa Rica ha aumentado en un 55 % entre los años 1995 al 2005, en donde la mayoría de los productores la cosechan de forma orgánica, lo cual es una ventaja competitiva ya que porcentualmente Costa Rica es el mayor productor orgánico de mora (Strik *et al.*, 2007). Sin embargo, existe una serie de desafíos, primero la dificultad para obtener certificaciones de producto por parte de la Unión Europea, así como la falta de organización de parte de los productores, además de carencia de soporte técnico e infraestructura comercial (Strik *et al.*, 2007; Montero, 2008).

De la producción nacional el 90 % se coloca en el mercado local, ya que como se mencionó anteriormente al no contar con certificaciones de producto orgánico hace más difícil la entrada del producto a otros mercados. En ese sentido la Asociación de Productores y Exportadores de Mora y Frutales de Altura (APROCAM) es la única que



cuenta con producto con certificado orgánico, sin embargo, no puede exportar toda la fruta, por lo que los excedentes se congelan y se comercializan a un precio inferior en el mercado nacional (Montero, 2008), por lo que es de interés darle un valor agregado a este excedente.

En el mercado de productos funcionales las bebidas han sido utilizadas como el medio para altas concentraciones de ingredientes funcionales, esto por su facilidad de consumo, pero también por la necesidad inherente del ser humano por el consumo de fluidos; además, los líquidos proveen un medio adecuado de disolución de componentes funcionales y son uno de los métodos más aceptados para el consumo de estos (Wootton-Beard & Ryan, 2011).

No existe una definición unificada de alimento funcional (Menrad, 2003; Verbeke, 2005; Siró *et al.*, 2008), por lo que se presentan varias estimaciones acerca del valor de mercado de los productos funcionales, las cuales varían según la definición que se dé para alimento funcional. De manera general, se estima que el valor de dicho mercado va de los 33 a los 61 mil millones de dólares (Menrad, 2003; Verbeke, 2005; Siró *et al.*, 2008). Los actores más importantes a nivel internacional son Estados Unidos, Japón y la Unión Europea (Menrad, 2003; Bech-Larsen & Scholderer, 2007; Siró *et al.*, 2008). De ahí la importancia de las certificaciones para poder exportar productos.

Sin embargo, se debe resaltar que más allá del valor del mercado, llama la atención el crecimiento que este ha tenido, estimado en al menos un 10% anual entre los años 1990 al 2005, lo cual llama mucho la atención con respecto al del resto de la industria de alimentos que es de un 2 a un 3% anual (Verbeke, 2005), lo que muestra el potencial de este tipo de mercado. Existen varias acciones que se pueden implementar para aprovechar este mercado, como dar a conocer los beneficios de los productos con antioxidantes, además de los alimentos en los que se encuentran; esto dado que usualmente el público tiene una mejor aceptación hacia un determinado componente de un alimento si conoce que este tiene algún beneficio, como en el caso de la vitaminas y los ácidos grasos omega-3 (Menrad, 2003).

Además, se debe ofrecer al consumidor un producto que contenga el componente de interés, procurando reducir al máximo las pérdidas de este durante su procesamiento. En el caso de la mora, Gancel *et al.* (2011) estudiaron las pérdidas de compuestos fenólicos y de la capacidad antioxidante determinada mediante el método H-ORAC que se

presentan al procesar de manera convencional jugo de mora; en este caso la disminución de la capacidad se estimó en un 45 %. Estos autores reportan que los procesos térmicos, especialmente el escaldado, reducen drásticamente las antocianinas y el contenido de compuestos fenólicos en el producto final va a variar en función del tipo de molécula, encontrándose pérdidas de hasta un 50%. Hager *et al.* (2008), reportan resultados similares durante la elaboración de jugo de frambuesas en cuanto a las pérdidas de compuestos antioxidantes por remoción de materia insoluble y efecto de los tratamientos térmicos, sin embargo, las pérdidas debidas a tratamientos térmicos no causaron disminución en la capacidad antioxidante el jugo.

Para el procesamiento de jugos una alternativa es la utilización de la microfiltración tangencial, ya que con esta tecnología se pueden reducir las pérdidas de aromas y sabores de la fruta (Pérez & Vaillant, 2003), además de preservar las propiedades funcionales y características como la coloración, o el contenido vitaminas (Meng *et al.*, 2006). Otra ventaja es que se logra tener un producto inocuo sin recurrir a un tratamiento térmico. Según Carneiro *et al.* (2002), en la elaboración de jugo clarificado de piña, se logra obtener un recuento de mohos y levadura; y de bacterias mesófilas de menos de 10 UFC/g, coliformes menos de 0,3 UFC/g y se reporta ausencia de *Salmonella* en 25 g, por lo que se podría ver la microfiltración tangencial como una alternativa para sustituir procesos térmicos. Esta metodología ha sido utilizada también por Vaillant *et al.* (2001) para obtener jugo de mango, piña, naranjilla, mora, granadilla y mandarina. Sin embargo, aun no se explota al máximo el potencial de esta tecnología ya que no existe mucha información que defina la viabilidad técnica y económica en una escala industrial (Vaillant *et al.*, 2008).

Existen varios estudios previos en los que se han analizado algunas variables operacionales para la elaboración de jugo clarificado de mora; por ejemplo, Montero (2008), encontró diferencias entre los flujos de permeado al utilizar varios métodos de extracción de jugo y tratamientos enzimáticos. En general, entre mayor es la concentración del preparado enzimático mayores son los flujos de permeado; además, este autor demostró que entre mayor sea la presión transmembranaria aplicada a la microfiltración tangencial, mayor es el flujo de permeado. Por otro lado, Soto (2010) evaluó el efecto que tiene la microfiltración tangencial sobre el contenido de compuestos antioxidantes, en función del método de extracción del jugo pulposo, ya sea prensado continuo o discontinuo. Se obtuvo mayor reducción de compuestos antioxidantes en los

jugos con prensado continuo, esto por tener una mayor cantidad de materia insoluble que es retenida por la membrana, aparte de la formación de una capa de gel en la membrana que aumenta la resistencia mecánica al paso de jugo a través de la membrana. Sobre los resultados de Montero (2008) y Soto (2010) es importante mencionar que el preparado enzimático aplicado por estos autores está actualmente discontinuado, por lo que se requiere seleccionar nuevas condiciones de maceración del jugo de mora.

En general la factibilidad de la microfiltración tangencial dependerá en gran manera no sólo de las condiciones propias de la operación, sino también de los tratamientos previos a esta, como el método para la extracción del jugo y la posible aplicación de un tratamiento enzimático con pectinasas y celulasas, además de las condiciones de dicha maceración enzimática. Es por ello que el objetivo de este estudio es optimizar el proceso de elaboración de jugo clarificado de mora, en cuanto a las metodologías de extracción de jugo, definiendo las condiciones óptimas para un tratamiento enzimático, empleando un preparado disponible en el mercado nacional. Además, se busca demostrar si el proceso propuesto ofrece una ventaja productiva significativa sobre el proceso actual, para establecer la mejor combinación de condiciones que permitan la obtención del mayor rendimiento y productividad en la etapa de microfiltración tangencial, en una empresa procesadora de frutas y vegetales.

## **II. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo general**

Optimizar el proceso de elaboración de jugo clarificado de mora mediante microfiltración tangencial acoplado a un tratamiento enzimático en una empresa procesadora de frutas y vegetales.

### **2.2 Objetivos específicos**

1. Seleccionar a partir de tres preparados enzimáticos disponibles en el mercado nacional, con actividad celulolítica y pectinolítica, el preparado que presente mejores resultados considerando rendimientos de extracción y características físico-químicas del jugo de mora, y su costo.
2. Optimizar las condiciones del tratamiento enzimático (tiempo y concentración del preparado enzimático) utilizando el preparado preseleccionado, para dos tipos de jugo de mora.
3. Definir el proceso de obtención de jugo de mora más adecuado que permita alcanzar los flujos y rendimientos más altos en la microfiltración tangencial (MFT) a nivel piloto, considerando los costos económicos.
4. Corroborar la factibilidad técnica del proceso mediante ensayos de MFT de larga duración a escala piloto.

### III. MARCO TEÓRICO

#### 3.1 Generalidades de la mora

##### 3.1.1 Descripción del fruto

El género *Rubus* se extiende a nivel mundial, menos en las zonas desérticas. Entre las variedades que se cultivan más comúnmente se encuentran la frambuesa roja europea (*Rubus idaeus* ssp. *vulgatus*), la frambuesa roja norteamericana (*Rubus strigosus*), la frambuesa negra norteamericana (*Rubus occidentalis*), y la mora híbrida andina (*Rubus glaucus* & *Rubus adenotrichos*), estas últimas son nativas en la zona desde México a Ecuador (Mertz *et al.*, 2007).

El fruto de la mora es de tipo agregado, es un conjunto de drupas, organizadas alrededor del mismo eje, las cuales contienen la semilla; en la mora tipo “vino” se han contado hasta 45 drupas. El desarrollo del fruto consta de tres etapas, primero una de crecimiento acelerado en donde predomina el contenido de clorofila sobre el de antocianinas por lo que el fruto es verde, otra de crecimiento lento en donde se da una disminución del pH por la síntesis de ácidos orgánicos y por la fijación de dióxido de carbono en ácido málico, además se da el crecimiento de las semillas, y finalmente una última de crecimiento rápido, cuando se produce la síntesis de antocianinas, por ende la generación de color morado y se generan azúcares (Castro & Cerdas, 2005).

##### 3.1.2 Compuestos antioxidantes presentes en la mora

En general las moras de la variedad andina, tienen una mayor cantidad de compuestos antioxidantes con respecto a otras frutas. Vasco *et al.* (2008) realizaron una medición de compuestos fenólicos en varias frutas de Ecuador; estos autores mencionan que la mora andina es el grupo de frutas con mayor contenido de compuestos fenólicos solubles, 2167 mg GAE (equivalentes de ácido gálico)/ 100 g, por encima de frutas como fresa, la guayaba, zapote, la granadilla, la naranjilla y mango, y también pudieron correlacionar este contenido de compuestos fenólicos con una alta eficiencia para estabilizar radicales libres mediante el análisis de estabilización del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil. Específicamente, la variedad *Rubus adenotrichos* presenta como principal grupo de compuestos fenólicos a los elagitaninos, que representan hasta un 61 % del total la fruta madura, mientras que las antocianinas representan el segundo grupo en compuestos

(Mertz *et al.*, 2007; Acosta-Montoya *et al.*, 2010). La mora de esta variedad contiene una mayor cantidad de elagitaninos en comparación a otras variedades de mora, y en lo que se refiere a capacidad antioxidante, medida mediante el análisis H-ORAC, es similar a otras frutas con reconocida capacidad antioxidante como los arándanos azules (Acosta-Montoya *et al.*, 2010).

En cuanto a los efectos beneficiosos de los antioxidantes, Huang *et al.* (2005) mencionan que en la ciencia de alimentos, los antioxidantes son aquellas sustancias que previenen reacciones de rancidez en grasas y, además, que existen los antioxidantes dietéticos que son sustancias en los alimentos capaces de reducir los efectos nocivos de especies reactivas como los radicales oxígeno y nitrógeno. Es decir, no todas las sustancias antioxidantes funcionan de la misma manera, por ejemplo la vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) estabiliza muy bien radicales libres pero no funciona muy bien para prevenir la peroxidación lipídica, mientras que los carotenoides no estabilizan radicales, sin embargo son inhibidores de la oxidación provocada por el oxígeno singlete (Niki & Noguchi, 2000).

Específicamente, en el caso de los principales compuestos antioxidantes presentes en la mora, los elagitaninos, son polifenoles pertenecientes a la clase de los taninos hidrolizables, derivados complejos del ácido elágico (Landete, 2011). Aun se está estudiando la metodología de absorción de los elagitaninos en el organismo humano. Actualmente, se sabe que los elagitaninos son hidrolizados en ácido elágico y este, en su mayoría, es metabolizado por la microbiota intestinal hasta convertirse en varios derivados de urolitina (Larrosa *et al.*, 2010; Landete, 2011).

Si se habla de los beneficios que tienen los elagitaninos, se mencionan varias propiedades biológicas, como ser antioxidantes, anti cancerígenos, prevención de la aterosclerosis, anti inflamatorios, anti hepatotóxicos, antibacteriales e inclusive que tienen actividad contra la replicación del virus VIH (Martino *et al.*, 2004). Sin embargo, aunque existe una fuerte evidencia *in vitro* de estas actividades, se presenta una cierta controversia ya que los resultados que se obtienen mediante estudios *in vivo* no corresponden con lo obtenido de forma *in vitro* (Wootton-Beard & Ryan, 2011). Esto porque es difícil comparar los compuestos fenólicos de varias fuentes distintas ya que no existe un método estándar de almacenamiento, preparación, extracción, purificación y análisis, ni una forma específica de reportar los distintos compuestos (Lee *et al.*, 2012). Por otra parte, no existe un método validado que pueda medir de manera confiable la capacidad antioxidante de los alimentos y muestras biológicas (Huang *et al.*, 2005), y finalmente se considera que una acción antioxidante directa por parte de compuestos

dietéticos es poco probable ya que la biodisponibilidad de estos es baja (Larrosa *et al.*, 2010; Landete, 2011; Wootton-Beard & Ryan, 2011). También se dice que los antioxidantes podrían tener algunos efectos antinutricionales ya que en animales se ha visto que disminuyen la digestión de proteínas, celulosa, pectinas y minerales (Landete, 2011).

De ahí, que se ha estudiado con mayor profundidad la manera en que se metabolizan los antioxidantes y los efectos que tiene estos metabolitos en el organismo; además que se le ha dado un giro a la acción de ciertos compuestos antioxidantes; por ejemplo, se considera que ciertos compuestos antioxidantes tienen otras funciones como mantener el equilibrio redox en el cuerpo, la estimulación de la respuesta antioxidante y varios roles en la interrupción de eventos neuroinflamatorios como los que ocurren en la enfermedad de Alzheimer, derrames cerebrales y otras enfermedades neurodegenerativas (Hensley *et al.*, 2000).

Anteriormente, se mencionó que los elagitaninos se metabolizan en el cuerpo a derivados de urolitina, por lo que propiamente la cantidad de elagitaninos y de ácido elágico en el torrente sanguíneo es muy baja; sin embargo, si se han estudiado los efectos que estos podrían tener en el cuerpo; por ejemplo, los derivados de urolitina tienen cierto poder antioxidante, aunque es menor que el de los elagitaninos, además los derivados de urolitina tiene actividad tanto estrogénica como anti estrogénica con beneficios a la salud (Landete, 2011).

Heber (2008), menciona que en estudios *in vivo* preliminares realizados en ratas a las cuales se les suministró extracto de granada real (*Punica granatum* L.) con un contenido de elagitaninos estandarizado, se logró disminuir la angiogénesis, que es el proceso de desarrollo maligno de células cancerígenas. Seeram (2008), también menciona experimentos en roedores, los cuales fueron alimentados con jugos de frutas (arándano, mora, granada, sandía, mango y ciruelas) y mostraron disminuciones significativas en la formación de células malignas. En ambos casos, los autores mencionan que si bien los resultados son prometedores se deben realizar más estudios en humanos. Finalmente, Larrosa *et al.* (2010) mencionan que existe evidencia comprobada con animales, que los elagitaninos, obtenidos del extractos de granada real, tienen propiedades antiinflamatorias a nivel intestinal y que estas se han ligado a los derivados de urolitina que se obtienen a partir de los elagitaninos, lo que sugiere que la actividad de los elagitaninos se da en donde estos son aplicados directamente.

### 3.1.3 Producción de la mora en Costa Rica

La producción de mora se da en las zonas montañosas del Valle Central, en donde la actividad consiste en una extracción con un mínimo de manejo que es básicamente solo la poda y la aplicación de abono, como gallinaza y carbonato de calcio, las plantaciones son dispersas ya que el fruto siempre ha crecido de forma silvestre en las zonas montañosas (Murillo & Arias, 2005, Montero, 2008).

Este es un producto con certificación orgánica de exportación, que tiene un volumen y un consumo de mano de obra importante; por ejemplo para el año 2004 se producían 964 toneladas por año, involucrando a 350 familias en el proceso de producción.

Sin embargo según datos de PROCOMER, del 2001 al 2007 hubo una contracción de un 80% en el valor de las exportaciones de mora, lo que también se vio en el volumen físico de mora exportada (Arias, 2008). La producción es organizada en su mayoría por la Asociación de Productores y Exportadores de Mora y Frutales de Altura (APROCAM), que agrupa a varios pequeños y medianos productores de mora que entregan el producto a APROCAM. La planta de procesamiento y empaque se encuentra en Tejar del Guarco en Cartago. El área de influencia principal son las reservas forestales Los Santos y Río Macho (Murillo & Arias, 2005).

Sin embargo, APROCAM ha tenido una caída en la cantidad de productores afiliados, ya que en el 2004 eran 360, en el 2005 bajaron a 250 y ya para el 2007 a 150 afiliados. Esto no quiere decir que necesariamente hayan desaparecido, sino que operan de manera independiente. Esto trae problemas en cuanto a dispersión de los estándares de calidad y menor capacidad de atender a los mercados de exportación (Arias, 2008).

APROCAM realiza la intermediación y la comercialización del producto, donde la mayoría de las compras son realizadas por importadores mayoristas o por parte de las cadenas de supermercados, que tienen sus propias agencias de importación, y de manera muy limitada por medianos y pequeños minoristas (Murillo & Arias, 2005).

Para este tipo de producto existe un reglamento técnico que ha sido creado por la Dirección de Calidad Agrícola del CNP, en donde se exigen entre las características para el producto fresco un color negro azulado, tamaño mediano a grande, punto de maduración de maduración óptimo que no sangre, sin partes rojas, sin presencia de basura ni de materiales extraños, ni daños mecánicos, en el caso del producto congelado este puede tener daños mecánicos leves y el tamaño puede ser más pequeño (Montero, 2008; Murillo & Arias, 2005).



Los principales importadores de mora a nivel internacional son Estados Unidos, Polonia, Hungría, Rumanía y Holanda, que se abastecen de países como Chile, Costa Rica, Guatemala, México, Colombia y Canadá, siendo el mercado holandés el mercado principal de la mora costarricense, en donde las exportaciones se dan de octubre a abril (Murillo & Arias, 2005).

El mercado es muy estacional, en donde los mejores meses para la venta son entre septiembre y noviembre. El precio se define por oferta y demanda, y se rige por medio del valor que tiene un *flat* de mora, que son 12 canastillas de mora cuyo precio suele oscilar entre los 8 y los 35 dólares por *flat* (Murillo & Arias, 2005).

Actualmente, la producción nacional enfrenta varios problemas: primero a nivel de organización ya que el número de productores asociados a APROCAM, ha disminuido de 360 en el 2004 a 150 en el 2008, lo que desorganiza la producción, además que se pierde la calidad estándar del producto que sale sin proceso de selección alguno, al mercado nacional especialmente, ya que no se aplica el reglamento técnico (Montero, 2008).

Por otro lado, en Costa Rica se produce mora de buena calidad pero se tiene un problema de costos de producción, y no ha sido posible introducir de manera generalizada la mora orgánica al mercado nacional, esto por la mala presentación que tiene el producto, y por falta de mano de obra para aumentar la producción; también, existen problemas en lo que se refiere al costo de la misma mano de obra, transporte, reglamentación y factores climáticos (Murillo & Arias, 2005).

Otro problema es que existe un mercado internacional que gusta de consumir de la mora directamente, sin embargo la variedad cultivada a nivel local es muy ácida para dicho fin por lo que se ha sugerido cultivar variedades más dulces; también, para intentar aumentar el consumo local se ha intentado elaborar productos con un valor agregado, para hacerlo más rentable (Murillo & Arias, 2005).

### **3.2 Jugos clarificados de frutas**

Una de las opciones para dar valor agregado a la producción de mora, es la elaboración de jugo clarificado. La clarificación por definición es el proceso mediante el cual se rompe la emulsión semiestable de carbohidratos vegetales coloidales que soportan toda una serie de materiales turbios insolubles, obteniéndose una disminución en la viscosidad, y la opacidad del jugo turbio cambia a una clara y limpia, lo que se logra mediante dos tipos de tratamientos: los enzimáticos y los no enzimáticos (McLellan & Padilla-Zakour, 2005).

En el presente estudio se realizó una combinación de ambos procesos para reducir el contenido de sólidos en suspensión y la turbidez del jugo.

Los jugos clarificados pueden ser concentrados y luego reconstituidos con la pulpa ya pasteurizada para obtener un jugo con mejores propiedades sensoriales. También se requiere para elaborar bebidas refrescantes, cocteles, aguas aromatizadas naturales, agua mineral, bebidas alcohólicas, téis fríos con jugo translúcido, confites, esencias naturales, salsas de frutas sin sólidos en suspensión, helados, jaleas y gelatinas (Vaillant *et al.*, 1999; Vaillant *et al.*, 2001; Montero, 2008). Se debe tomar en cuenta el potencial que puede tener el producto si se consideran sus propiedades funcionales, ya que globalmente ha surgido un nuevo mercado para estos productos conocido como de “salud y bienestar”, y este en el 2012 alcanzó un valor mundial de 625 mil millones de dólares (Khan *et al.*, 2013).

### **3.3 Metodologías de extracción de jugos de frutas**

#### **3.3.1 Generalidades**

El Codex Alimentarius define a un jugo como el líquido no fermentado, pero fermentable, obtenido de la parte comestible de frutas frescas, en buen estado y en un estado de maduración apropiado (CODEX, 2005). Este proceso puede requerir de una molienda o troceado de la fruta antes de la extracción del jugo e inclusive puede que haga falta realizar algún tratamiento enzimático al puré obtenido, antes de proceder con un proceso de prensado o antes de decantar (McLellan & Padilla-Zakour, 2005).

Luego de la extracción del jugo se adecúa el proceso de acuerdo con el producto final que se quiera obtener; por ejemplo, si es aceptable obtener un jugo turbio se puede omitir la etapa de clarificación o ésta solo puede consistir de una filtración gruesa o centrifugación. En cambio, si se requiere un jugo sin sólidos en suspensión se debe realizar algún proceso de depectinización con enzimas, una filtración fina, o una centrifugación a alta velocidad. Si lo que se va a preparar es un jugo, el paso siguiente es un procedimiento para su estabilización, ya sea mediante una pasteurización o algún otro proceso que sea equivalente antes de empaquetar el jugo; pero si lo que se va a preparar es un concentrado el jugo debe pasar por un proceso para la remoción de agua, ya sea en un evaporador o con otra tecnología como la ósmosis inversa (McLellan & Padilla-Zakour, 2005)

### 3.3.2 Despulpado

El despulpado es una metodología de extracción de jugo que se puede utilizar para diversos tipos de frutas, el objetivo es la separación de la mayoría de los componentes deseables de la fruta del material indeseable (Bates *et al.*, 2001).

Se puede utilizar un despulpador de paletas con las mallas apropiadas para realizar la separación del producto (Bates *et al.*, 2001). Estas fuerzan al producto a través del tamiz ejerciendo fuerzas de cizalla y de compresión sobre el producto, dando como resultado la separación de la pulpa y del residuo, que está constituido de semillas y otras partes fibrosas (Soto, 2010).

### 3.3.3 Prensado

Se puede separar el jugo de las estructuras vegetales mediante la aplicación de presión (Brennan *et al.*, 2006); el prensado separa al sistema alimenticio en dos fases, una fase sólida que está compuesta por el tejido vegetal y una líquida que es líquido comprendido entre las partículas (Horváth-Kerkai, 2006).

Durante el prensado, una fuerza externa crea tensión en el sistema, lo que drena el líquido y esto resulta en un cambio de la forma de las estructuras vegetales; El equipo utilizado debe impedir la pérdida de la fase sólida y a su vez canalizar la fase líquida en un recipiente (Horváth-Kerkai, 2006).

Se puede realizar un prensado de manera discontinua, este tradicionalmente se ha realizado con una prensa hidráulica. En esta metodología se coloca el producto en una manta de algodón o *nylon*, ésta a su vez se coloca en una canasta de acero inoxidable y se somete a la acción de un pistón hidráulico, el cual prensa el jugo (McLellan & Padilla-Zakour, 2005). En la presente investigación se utilizó un equipo distinto que sin embargo utiliza un principio similar, conocido como hidroprensa. La diferencia reside en que la presión no es dada por un pistón hidráulico, sino por un neumático cilíndrico que se llena de agua; alrededor de este neumático hay un cilindro con aperturas de acero inoxidable que tiene en su cara interna una manta de *nylon*; es en el espacio entre el neumático y el cilindro en donde se coloca el producto (ver figuras 1 y 2).



**Figura 1.** Hidroprensa para el prensado de manera discontinua de mora.



**Figura 2.** Hidroprensa para el prensado de manera discontinua de 40 L Carezza (Enotecnica Pillan, 2013)

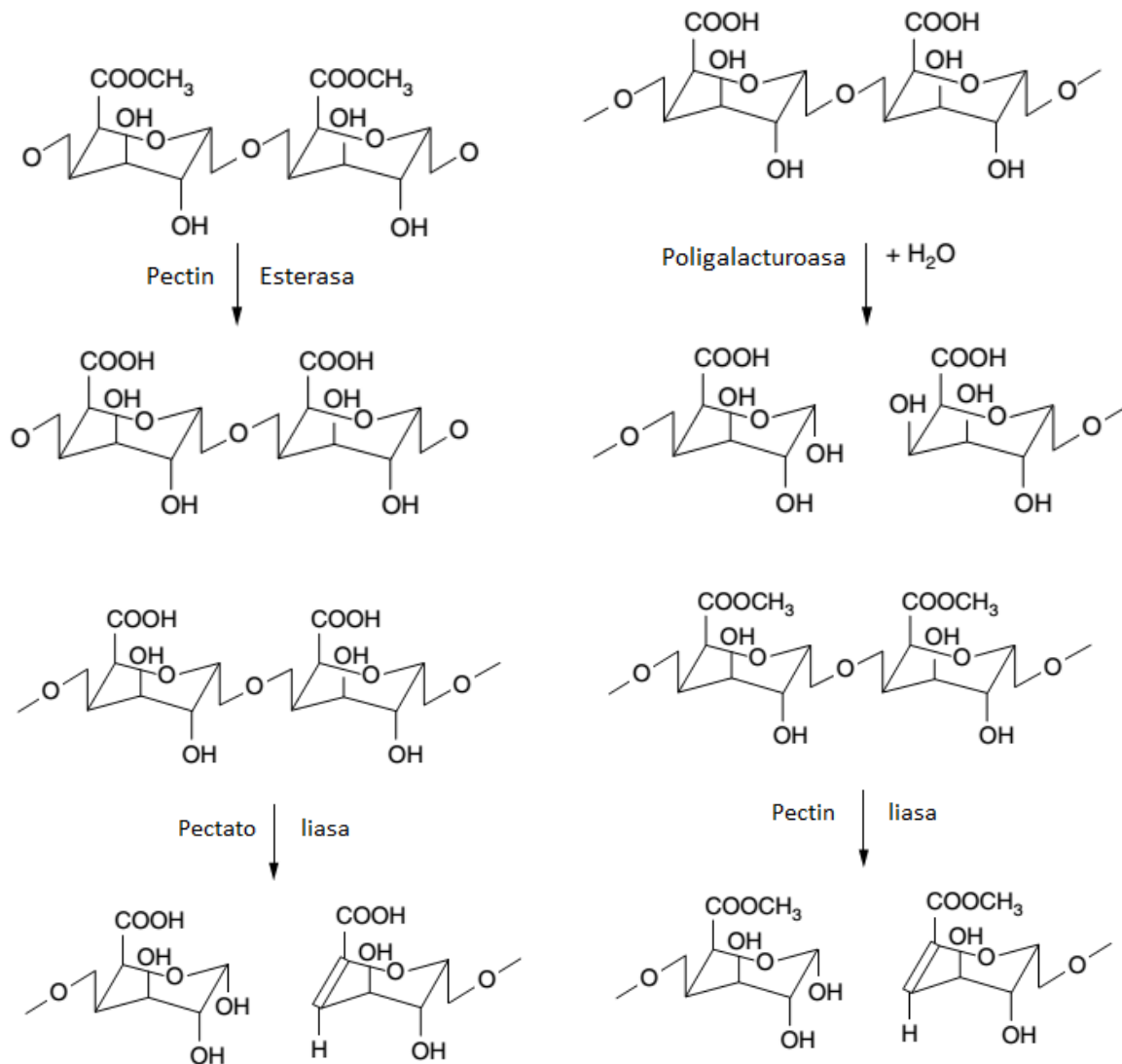
También se puede realizar el prensado de manera continua, de esta forma entre los equipos que se utilizan está la prensa de tornillo. Este consiste de una malla de acero inoxidable cilíndrica que rodea a un tornillo sin fin, con poco espacio entre el tornillo y la malla, la presión es dada al final de esta cámara y es ajustable (McLellan & Padilla-Zakour, 2005). Cuando el producto entra en contacto con el tornillo permite el movimiento de la masa dentro del equipo, mientras que el tornillo provee la fuerza de compresión y cizalla necesarias para forzar el producto a través de la malla, lo que libera el jugo el cual es recogido en un recipiente (Soto, 2010).

### **3.3.4 Tratamientos enzimáticos**

El propósito de utilizar enzimas es aumentar la extracción de jugo de la materia prima, incrementar la eficiencia de operaciones como el prensado o la remoción de sólidos y dejar el producto final sin turbidez alguna. Estas se pueden aplicar en dos momentos durante el proceso, para el tratamiento del puré de fruta con el fin de obtener la mayor cantidad de jugo de este y durante la etapa de clarificación para clarificar el jugo y llevar el proceso de clarificación de manera más fácil (Höhn *et al.*, 2005).

Los jugos que se obtienen después de la extracción son usualmente turbios debido a las partículas vegetales presentes que son insolubles en agua, como fibras, celulosa, hemicelulosa, protopectinas, almidón y lípidos; y los que son solubles en agua, que corresponden a macromoléculas coloidales, como pectina, proteína, fracciones de almidón soluble, algunos polifenoles y sus derivados oxidados o condensados (Horváth-Kerkai, 2006).

Es por lo anterior que los preparados enzimáticos, al menos en teoría, contienen una mezcla de actividades enzimáticas con el fin de obtener un alto grado de hidrólisis para una determinada fruta (Höhn *et al.*, 2005). Por ejemplo es común utilizar una combinación de enzimas con actividad celulolítica y pectinolítica ya que tienen un efecto sinérgico; entre las enzimas pectinolíticas utilizadas están predominantemente la poligalacturonasa, la pectin y pectato liasa, además de la pectin esterasa para mejorar la actividad de la poligalacturonasa (ver figura 3); también se tiene actividad celulasa para hidrolizar polisacáridos no pécticos como la celulosa, glucanos y xilosa, presentes en las paredes celulares (McLellan & Padilla-Zakour, 2005).



**Figura 3.** Acción de los distintos tipos de enzimas en un preparado comercial (adaptado de McLellan & Padilla-Zakour, 2005).

### 3.4 Tecnología de membranas

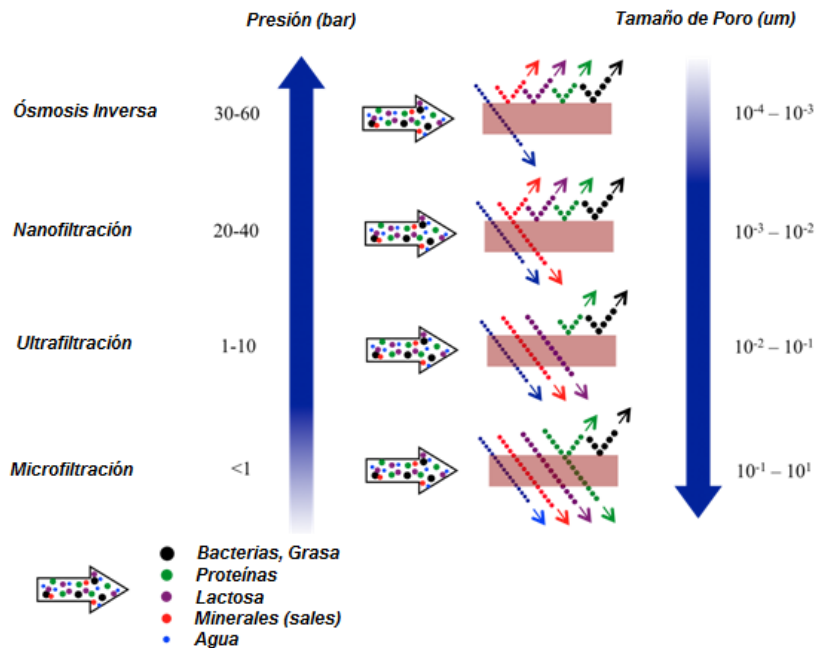
#### 3.4.1 Generalidades

El objetivo de la clarificación es remover todas las macromoléculas mencionadas anteriormente, que se encuentran en un jugo cuando éste es extraído; el proceso convencional para esto se realiza mediante un tratamiento enzimático, luego se agregan agentes para refinar el producto como gelatinas y bentonita, para finalmente llevar a cabo

un proceso de filtración normal, en el cual se utilizan coadyuvantes como las diatomeas que facilitan el proceso de filtrado. Este proceso consume mucho tiempo y se lleva a cabo de manera no continua; además, debido a la cantidad de agentes que se utilizan, el jugo puede quedar con sabores extraños y estos agentes no pueden ser reutilizados por lo que generan un problema de contaminación para su adecuado desecho (DasGupta & Sarkar, 2012).

De ahí que en los últimos 60 años se han desarrollado las tecnologías de membranas, que utilizan la presión como fuerza motriz, en la mayoría de los casos, para pasar una solución o una dispersión coloidal por una membrana semipermeable con el fin de separar componentes de esta (Brennan *et al.*, 2006). Estos procesos son energéticamente más eficientes que el proceso tradicional, y son una vía alternativa para obtener jugos clarificados de alta calidad, libres de aditivos y con un sabor fresco (DasGupta & Sarkar, 2012).

Existen varios tipos de procesos de separación de membranas, ósmosis inversa, nanofiltración, ultrafiltración, microfiltración, electrodiálisis y pervaporación. De estos, cuatro son los que tienen a la presión como fuerza motriz principal, la ósmosis inversa, la nanofiltración, la ultrafiltración y la microfiltración (Cheyran, 1998). Sus características de separación se pueden ver en la figura 4.



**Figura 4.** Tecnologías de membrana basadas en presión y sus características de separación (Adaptado de Wu & Imai, 2012).

La ósmosis inversa idealmente retiene todos los componentes; la nanofiltración utiliza membranas cargadas con poros mayores que los de las membranas de la ósmosis inversa, pero demasiado pequeños para permitir el permeado de muchos compuestos orgánicos como el azúcar. Las membranas de nanofiltración tienen la utilidad especial de poder separar entre las formas disociadas y no disociadas de un mismo compuesto, por ejemplo no permiten el paso de ácido láctico a valores de pH altos, en su forma de sal, pero sí lo hacen a pH bajos. Por otro lado, la ultrafiltración retiene solo macromoléculas y partículas con un tamaño mayor a aproximadamente de 10 a 200 Å (0,001 a 0,02 µm), y finalmente la microfiltración se usa primordialmente como una técnica de clarificación, ya que puede separar sólidos en suspensión de partículas disueltas, en tanto dichas partículas cumplan con los requerimientos de tamaño de la microfiltración (Cheyran, 1998).

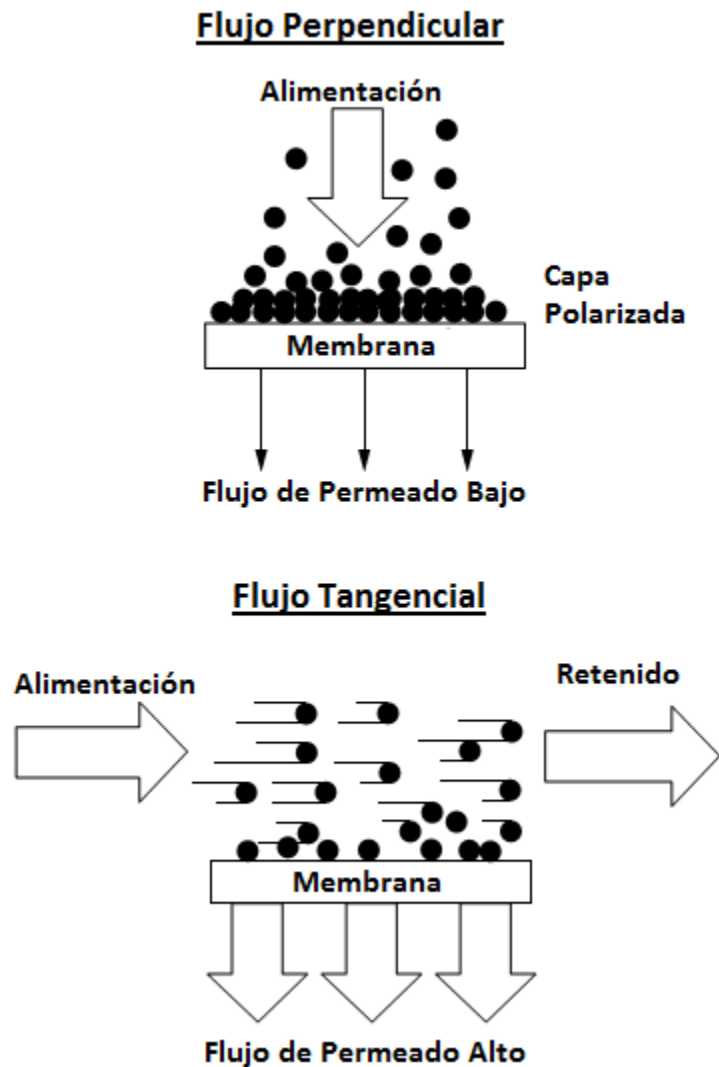
### **3.4.2 Microfiltración tangencial**

La microfiltración tangencial como se mencionó anteriormente se utiliza para separar partículas suspendidas en un medio líquido y es considerada generalmente como una alternativa a la filtración convencional o a la centrifugación. El producto de interés puede ser el permeado, el concentrado que ha sido retenido o ambos. Como ventajas sobre los tratamientos tradicionales es que es un proceso completamente físico, que no utiliza aditivos, reduce costos y se obtiene un producto de mejor calidad (Brennan *et al.*, 2006).

El proceso consiste en hacer pasar el producto que se desea clarificar a través de una membrana que retendrá determinados materiales según las características de esta; la filtración se puede llevar a cabo ya sea con un flujo perpendicular sin salida, en donde el producto alimento es forzado a través de la membrana, o se puede hacer de manera tangencial, en donde se bombea el producto a presión sobre la superficie de la membrana (ver figura 5) (Cheyran, 1998; Guizard & Amblard, 2009). El proceso con flujo perpendicular tiene la ventaja de tener un menor costo energético; sin embargo, el flujo del filtrado decae rápidamente (Guizard & Amblard, 2009), mientras que el método con flujo tangencial no solo es más rápido sino que tiene la propiedad de que se obtienen dos tipos de flujo de producto, el permeado que es la fracción que pasa a través de la membrana, sin macromoléculas, y el retenido, que es un flujo concentrado en



macromoléculas que no lograron pasar por la membrana, por lo que se puede recuperar cualquiera de los dos (Cheyran, 1998).

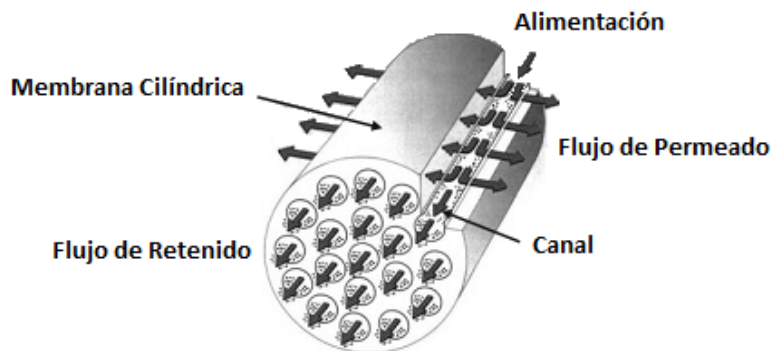


**Figura 5.** Representación esquemática del flujo de alimentación perpendicular y tangencial (Adaptado de McLellan & Padilla-Zakour, 2005).

Las membranas que están hechas de cerámica tienen la ventaja de tener una mayor resistencia a la abrasión con respecto a las membranas poliméricas, pueden operar a presiones más altas, a mayor temperatura y se pueden autoclavar (McLellan & Padilla-Zakour, 2005; DasGupta & Sarkar, 2012); sin embargo, no son de uso tan popular debido

a que su fabricación es más costosa; además las membranas cerámicas tienen tamaños de poros menores y se reporta que tienen bajos flujos de permeado en comparación con la poliméricas. Pero, si se considera el costo de mantenimiento y de operación, como la limpieza, las membranas de cerámica son mejores para ciertas aplicaciones como el tratamiento de leche y jugos (Guizard & Amblard, 2009).

Los tamaños de poro usuales de una membrana de cerámica son de 0,1  $\mu\text{m}$  a 0,6  $\mu\text{m}$ , y se acomodan en módulos de acero inoxidable donde se puede alojar a una o varias membranas, su forma puede ser cilíndrica o hexagonal con varios canales en su interior para el paso del producto como se muestra a continuación en la figura 6. Se puede observar que el retenido sigue a través del canal mientras que el permeado atraviesa la pared de la membrana en otra dirección (McLellan & Padilla-Zakour, 2005; Guizard & Amblard, 2009).



**Figura 6.** Diagrama del elemento de membrana (tomado y adaptado de Guizard & Amblard, 2009).

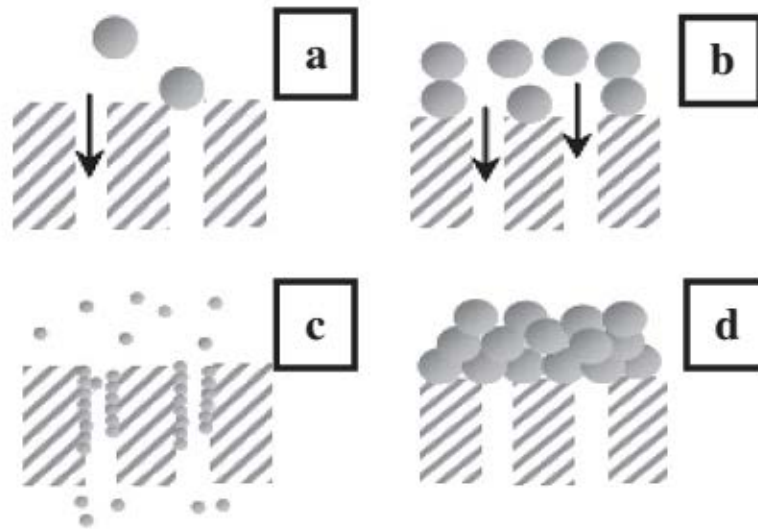
Otra ventaja de la microfiltración tangencial es la reducción de la carga microbiana en el permeado al utilizar esta tecnología, ya que las células bacterianas son demasiado grandes para atravesar los poros de las membranas; Guizard & Amblard (2009), mencionan que la microfiltración se usa en la clarificación y pasteurización de jugos de frutas. McLellan & Padilla-Zakour (2005) indican que con membranas de material inorgánico (polisulfona y alúmina) con poros de 0,2  $\mu\text{m}$  es posible obtener jugos estériles de manzana; finalmente Brennan *et al.* (2006) mencionan que la microfiltración tangencial puede tener como objetivo ya sea la clarificación de un producto o recuperar partículas como coloides o células a través del retenido, además que en pruebas con suero se han obtenido reducciones de microorganismos de hasta 5 logaritmos.

### 3.4.2.1 Proceso del colmataje

La principal desventaja que tiene la microfiltración tangencial es el colmataje de las membranas, debido a varios fenómenos tales como: la adsorción de solutos en la parte externa de la membrana, mientras que en la parte interna de los poros ocurre el bloqueo de estos por la retención de solutos y la formación de una torta de filtración sobre la superficie de la membrana, lo cual reduce el flujo de permeado que a su vez compromete la productividad del proceso (Vladisavljević *et al.*, 2003; Pagliero *et al.*, 2011).

El colmataje de la membrana se debe a dos procesos, la polarización por concentración y la obstrucción de la membrana. En general, el comportamiento del flujo de permeado durante la microfiltración tangencial consiste de una caída rápida del flujo de permeado al inicio del proceso, seguido de una disminución gradual durante cierto tiempo hacia un valor estable, esto es la polarización por concentración (Cassano *et al.*, 2007). Por otro lado, las distintas sustancias que se van acumulando sobre la superficie de la membrana pueden tener interacciones físico-químicas con la membrana, estos son mecanismos de obstrucción de la membrana (Cassano *et al.*, 2007; DasGupta & Sarkar, 2012).

La polarización por concentración es un proceso reversible aplicando un protocolo de limpieza de la membrana; sin embargo, el proceso de obstrucción de la misma no lo es, así que no importa si se aplican protocolos de limpieza nunca se logra recuperar el valor de permeabilidad de la membrana (DasGupta & Sarkar, 2012). De acuerdo con El Rayess *et al.* (2012), existen cuatro modelos que describen los mecanismos que reducen el flujo en una membrana (ver figura 7); el primero es cuando una partícula más grande sella el poro de la membrana (a), las partículas son más grandes que el poro, por lo que son retenidas en la superficie de la membrana, las partículas no se depositan unas sobre otras; el segundo modelo es el de bloqueo parcial del poro (b), en este modelo al igual que el anterior se asume que las partículas que quedan en la superficie de la membrana bloquean el poro, pero considera que las partículas sí se depositan sobre las que han sido retenidas por la membrana; el tercer mecanismo (c), es el bloqueo interno de los poros, el cual considera que las paredes internas se cubren gradualmente con partículas pequeñas, las cuales disminuyen la sección transversal del poro a través del tiempo; finalmente se tiene la formación de un depósito sobre la superficie de la membrana (d), que forma una torta sobre la superficie de la membrana compuesta por partículas más grandes que los poros de la membrana.



**Figura 7.** Mecanismos de bloqueo de una membrana (tomado de El Rayess *et al.*, 2012).

Cuando se clarifican jugos con un alto contenido de pulpa se tiene una gran concentración de compuestos capaces de bloquear la membrana, por lo que el proceso es tedioso. Las sustancias responsables de esto usualmente son los sólidos en suspensión presentes en el jugo, polisacáridos insolubles provenientes de las paredes celulares como pectina, celulosa, hemicelulosa y lignina (Vaillant *et al.*, 2001). Para reducir el proceso de polarización por concentración y los subsecuentes mecanismos de obstrucción de la membrana se debe reducir la cantidad de estos compuestos presentes en el jugo alimentado en el sistema, ya sea mediante métodos de extracción de jugo que produzcan una menor cantidad de sólidos en suspensión o tratamientos enzimáticos o la combinación de ambos (Vaillant *et al.*, 2001; DasGupta & Sarkar, 2012).

#### 3.4.2.2 Variables que afectan a la MFT

De acuerdo con Ortiz *et al.* (2008), la microfiltración está gobernada por la ley de Darcy, en donde el flujo de permeado ( $J$ ) es una función de la presión transmembranaria ( $P_{tm}$ ), la resistencia total ( $R_t$ ) y la viscosidad del producto ( $\mu$ ), como se puede ver en la ecuación 1:

$$J = \frac{P_{tm}}{\mu R_t} \quad (\text{Ecuación 1})$$

De acuerdo con esta teoría existen una serie de variables operacionales que afectarán de una forma u otra el flujo de permeado que se va a obtener.

### 3.4.2.2.1 Presión transmembranaria

La presión transmembranaria ( $P_{tm}$ ) está dada por la diferencia de presión entre la entrada y la salida de producto de la membrana (Ortiz *et al.*, 2008), matemáticamente se define por la siguiente expresión:

$$P_{tm} = \frac{(P_{ent} - P_{sal})}{2} - P_{per}$$

(Ecuación 2)

Donde  $P_{ent}$  es la presión de entrada del producto alimentado a la membrana,  $P_{sal}$ , es la presión de salida del retenido y  $P_{per}$  es la presión del permeado al salir de la membrana (Montero, 2008). El efecto de la  $P_{tm}$  sobre el flujo de permeado muchas veces es difícil de predecir y depende mucho de las características propias de la materia prima que se va a procesar (Ortiz *et al.*, 2008). A una presión de operación constante el flujo decae como resultado de la obstrucción de la membrana, si se estuviese pasando solo agua a través de la membrana al aumentar la  $P_{tm}$  el flujo aumentaría. Sin embargo, cuando se trata de líquidos con sólidos en suspensión una mayor  $P_{tm}$  puede causar una caída más abrupta en el flujo inicial de permeado, ya que al incrementarse este parámetro aumenta la concentración por polarización y la formación de una capa de gel en la superficie de la membrana (Huang *et al.*, 2012).

### 3.4.2.2.2 Temperatura

La temperatura afecta el valor de flujo de permeado, a mayor temperatura disminuye la viscosidad del producto, por ende aumenta la difusión (Cheyran, 1998; Ortiz *et al.*, 2008); además, al reducirse la viscosidad del producto, la energía requerida para el bombeo del mismo disminuye y se previene el crecimiento de microorganismos, esto a más de 55 °C, lo cual es otra ventaja de trabajar a altas temperaturas (Cheyran, 1998). Sin embargo, existe un límite, ya que se debe tener cuidado con productos que a altas temperaturas presenten precipitación de sales insolubles, así como la gelatinización de almidones o precipitación de proteínas, lo cual podría colmatar la membrana muy rápidamente, además del simple hecho de que las temperaturas muy altas pueden dañar la calidad sensorial y funcional del producto (Cheyran, 1998; Ortiz *et al.*, 2008).

### 3.4.2.2.3 Velocidad lineal o tangencial

Al aumentar la velocidad tangencial aumentará el flujo de permeado; sin embargo, esto tiene un costo energético ya que se debe utilizar más energía en cuanto al bombeo del producto. El aumento se debe a que se da un flujo turbulento del fluido dentro de la membrana, lo que produce un efecto de limpieza del soluto acumulado en la superficie de la membrana, reduciendo la resistencia hidráulica de la torta de filtración (Cheyran, 1998; Ortiz *et al.*, 2008).

### 3.4.2.2.4 Factor de reducción volumétrico (FRV)

Es la relación que existe entre el volumen de producto total alimentado al sistema y el volumen retenido dentro del sistema, como se muestra en la siguiente ecuación:

$$FRV = \frac{V_a}{V_r} = \frac{(V_p + V_r)}{V_r}$$

(Ecuación 3)

En donde  $V_a$ , es el volumen alimentado y  $V_r$  es el volumen de retenido. A su vez  $V_a$  está dado por la suma entre  $V_r$ , y  $V_p$  que es el volumen de permeado (Montero, 2008). Es una medida indirecta del rendimiento;

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{FRV - 1}{FRV}$$

(Ecuación 4)

Un mayor valor de FRV se asocia con un mayor rendimiento en la operación; sin embargo, también al tener un mayor FRV se tiene un menor flujo de permeado, debido a que es mayor la concentración de solutos en el retenido, lo que aumenta los costos de operación (Vaillant *et al.*, 2001).

### 3.4.2.2.5 Pretratamientos enzimáticos

El flujo de permeado va a decrecer de manera exponencial con respecto a la concentración de la materia prima alimentada, lo cual no depende ni de la velocidad de flujo, ni de la temperatura (Cheyran, 1998). Durante la microfiltración de jugos pulposos, la obstrucción de la membrana se da por la presencia de pectinas, taninos, proteínas, almidón, fragmentos de paredes celulares, hemicelulosa, celulosa y microorganismos; el depósito de estas sustancias sobre la superficie de la membrana produce una capa de gel impermeable sobre esta, por lo que se deben realizar tratamientos con enzimas antes del filtrado del jugo para reducir la colmatación de la membrana (Vaillant *et al.*, 1999; Carneiro *et al.*, 2002; Vaillant *et al.*, 2008).

#### **3.4.2.2.6 Turbidez de los flujos**

La turbidez mide la capacidad de dispersar la luz por parte de una solución; esta depende de la forma, el tamaño y la composición de las partículas, así como de su índice de refracción relativo y en menor grado del color de la disolución; sin embargo, estos dos factores se asumen como constantes cuando se miden frutas de la misma especie, por lo que se obtiene una medida de la concentración, la forma y el tamaño de las partículas de jugos diferentes de la misma especie (Vaillant *et al.*, 2008).

El aumento de la turbidez se debe al incremento del contenido de sólidos en suspensión presentes en el jugo por lo que, como se mencionó anteriormente, la concentración de solutos es más alta, lo que disminuirá el flujo de permeado durante la filtración (Vaillant *et al.*, 2001; Vaillant *et al.*, 2008). También, al darse un tratamiento enzimático puede ocurrir un incremento de la turbidez del jugo debido a que se hidrolizan las estructuras de las paredes celulares, por lo que se da un aumento en la cantidad de sustancias que provocan la turbidez (Landbo *et al.*, 2007; Vaillant *et al.*, 2008); sin embargo, hay otros parámetros que decrecen como la viscosidad del jugo.

### **3.5 Metodología de la superficie de respuesta**

Cuando muchos factores e interacciones afectan la variable respuesta que se desea optimizar, la metodología de superficie de respuesta (MSR) es una herramienta para dicho proceso. La MSR es un método estadístico que usa datos cuantitativos de diseños experimentales adecuados para determinar y resolver ecuaciones con variables múltiples (Rastogi & Rashmi, 1999). Esta metodología tiene la ventaja que muestra las interacciones existentes entre las variables independientes, así se puede ver los efectos netos de las variables, además que se reduce el número de ensayos requeridos para obtener la evaluación e interacción de los parámetros (Rai *et al.*, 2004; Liyana-Pathirana & Shahidi, 2005; Lee *et al.*, 2006; Sin *et al.*, 2006; Télesphore & He, 2009).

Usualmente se utiliza un diseño experimental central compuesto rotativo, para ajustar un polinomio de primer o segundo orden por una técnica de menos significancia. Se emplea una ecuación que describa cómo las variables independientes explican las variaciones en la variable respuesta, obteniéndose un gráfico de contorno en donde se puede establecer una zona con las condiciones óptimas (Rastogi & Rashmi, 1999; Liew Abdullah *et al.*, 2007).

## **IV. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1 Localización del proyecto**

El proyecto se llevó a cabo en el Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA) y en el Laboratorio de Química de la Escuela de Tecnología de Alimentos, ubicados en la Ciudad Universitaria Rodrigo Facio en San Pedro de Montes de Oca.

Se realizó una caracterización del proceso en las condiciones que se tenía en una empresa procesadora de frutas y vegetales ubicada en Zarcero, con el fin de obtener un parámetro comparativo para la extracción del jugo y observar el desempeño del equipo de MFT disponible en dicha empresa.

El proceso de selección y optimización del preparado enzimático para maximizar el rendimiento de producción de jugo de mora, la caracterización física del jugo pulposo producido en la empresa y todos los ensayos de MFT se realizaron en la planta piloto del CITA y en el Laboratorio de Química de la Escuela de Tecnología de Alimentos.

### **4.2 Materia prima**

Se utilizó mora (*Rubus adenotrichos*), suministrada por APROCAM, en estado maduro y congelado (-20 °C). Estas frutas se cosechan en la zona sur de Cartago y San José, en las zonas aledañas al Cerro de la Muerte y la zona de los Santos.

La materia prima se recibió congelada y se homogenizó todo el lote, después se distribuyó en baldes de 10 kg de mora y se mantuvieron en congelación. Posteriormente, la fruta se descongeló durante 24 h en refrigeración antes del proceso.

### **4.3 Preparados enzimáticos**

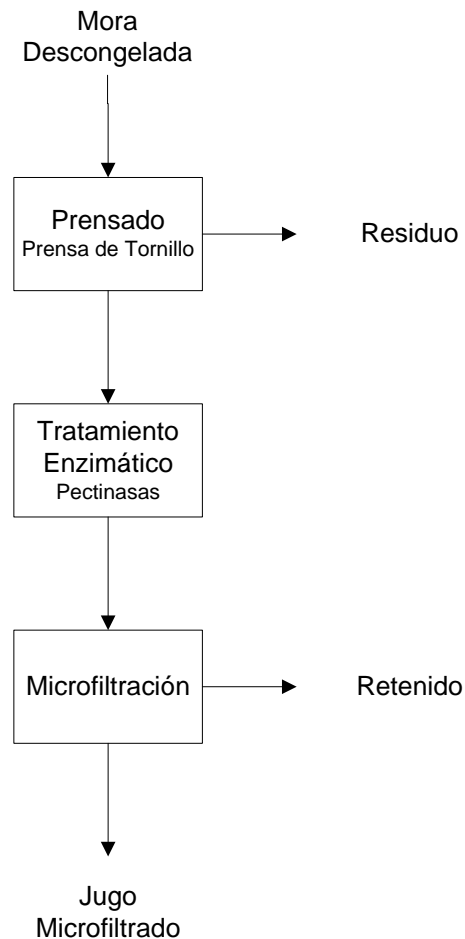
Se utilizaron preparados enzimáticos, con actividad celulasa, pectinasa y poligalacturonasa, que no provienen de microorganismos genéticamente modificados. En este caso se seleccionaron los preparados (A), (B) y (C), que tienen representación en Costa Rica y están disponibles para el mercado nacional; el pedido mínimo es de 25 kg de preparado comercial.



#### 4.4 Pruebas preliminares

##### 4.4.1 Caracterización del proceso y del jugo elaborado en la empresa

Se caracterizó el proceso de elaboración de jugo pulposo en la empresa. Partiendo de un lote de mora homogéneo se elaboró un jugo pulposo mediante el uso de una prensa de tornillo sin fin, disponible en la empresa, como se muestra en la figura 8.



**Figura 8.** Metodología del procesamiento de jugo microfiltrado de mora utilizada en la empresa procesadora de frutas y vegetales.

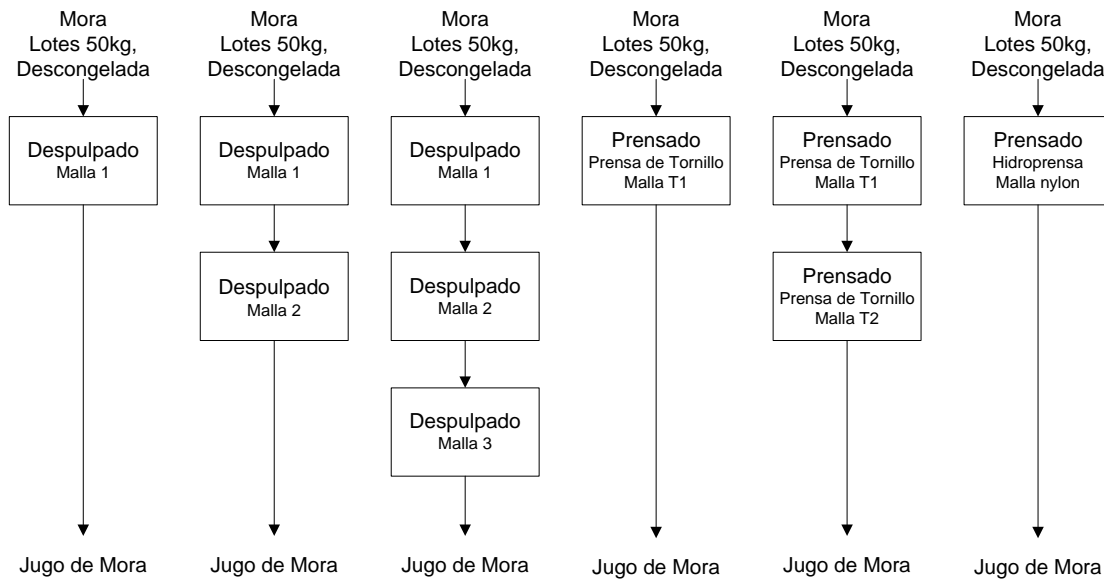
Durante el proceso de elaboración del jugo pulposo, se tomaron muestras de jugo luego del prensado. A estas muestras se les determinó el pH, la turbidez, el contenido de sólidos insolubles en suspensión, sólidos solubles y el color, mediante los parámetros  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ; además, se obtuvo el rendimiento de la operación.

Luego se aplicó un tratamiento enzimático con un preparado comercial. Se tomó una muestra de jugo luego del tratamiento a la cual se le realizaron los mismos análisis mencionados anteriormente. Con el jugo obtenido se realizó la microfiltración tangencial. Se tomó el flujo de permeado cada minuto durante 1 hora para conocer el comportamiento del flujo durante el proceso; también, se tomó una muestra del jugo clarificado y una muestra del retenido cada 5 min, y se realizaron los mismos análisis que a las muestras del proceso de elaboración del jugo pulposo. Esto con el fin de caracterizar los productos que se pueden obtener en la empresa, y para poder simular estas características en la planta piloto del CITA.

#### **4.4.2 Elaboración del jugo pulposo en la planta piloto del CITA**

Se estudiaron diferentes metodologías de extracción a nivel piloto con el fin de establecer un proceso para producir un jugo similar al obtenido en la empresa, para usar éste en las distintas pruebas de la investigación. Aparte, se observó si alguna de las metodologías ofrecía ventajas sobre el proceso base, para en paralelo realizar el análisis de esta.

- Con lotes homogéneos de 50 kg de mora congelada, los cuales se colocaron en baldes y se descongelaron en una cámara de refrigeración 24 h antes de la realización de la prueba, se extrajo el jugo según se muestra en la figura 9.



**Figura 9.** Metodologías de extracción de jugo de mora.

Para las distintas metodologías de extracción se utilizaron los equipos disponibles en la planta piloto del CITA, entre ellos el despulpador piloto, con capacidad mínima de 20 kg, y tres mallas (el tamaño de apertura es Malla 1>Malla 2>Malla 3), así como una prensa de tornillo sin fin con dos mallas (donde el tamaño de apertura es Malla T1>Malla T2) y una hidroprensa modelo Carezza con capacidad de 40 L (Enotecnica Pillan, Italia) con una malla de tejido de nylon, como se muestra en la figura 10.



**Figura 10.** Hidroprensa de la marca Enotecnica Pillan, modelo Carezza.

Mediante un diseño irrestricto aleatorio se evaluó el rendimiento de extracción y la dificultad del proceso (de forma cualitativa, como las tandas mínimas y capacidad del equipo, así como el tiempo requerido y la dificultad del procedimiento de lavado del equipo y se tomaron muestras para la determinación del porcentaje de sólidos insolubles en suspensión de los jugos producidos en cada método de extracción, cada prueba se realizó por triplicado.

#### 4.4.3 Pruebas preliminares para la optimización del tratamiento enzimático del jugo pulposo de mora

Mediante la aplicación de un diseño irrestricto aleatorio, empleando el preparado enzimático más adecuado definido previamente, se evaluaron los cuatro tratamientos correspondientes a los puntos axiales del diseño experimental propuesto en la sección 4.5.1, cuyas variables son el tiempo de tratamiento, donde  $t_1 < t_2 < t_3$  y la concentración de enzima, donde  $C_1 < C_2 < C_3$ ; se realizaron dos repeticiones por tratamiento. En el cuadro I se pueden ver los niveles de cada factor utilizado:

**Cuadro II.** Variables y niveles a utilizar en el diseño central compuesto.

Factores	Niveles		
	-1,414	0	1,414
Concentración de enzima (ppm)	$C_1$	$C_2$	$C_3$
Tiempo de proceso (min)	$t_1$	$t_2$	$t_3$

Esto se efectuó con el fin de determinar si el ámbito de variación entre los factores evaluados para la optimización del tratamiento enzimático, produce una diferencia considerable en las variables respuesta que se evaluaron. Estas variables fueron el rendimiento de extracción de jugo, el porcentaje de sólidos insolubles en suspensión, la turbidez y la viscosidad. Esto porque en caso de no obtenerse una diferencia no se realizaría la optimización con dicha variable. Esta prueba preliminar se realizó dos veces en la primera ocasión para jugo pulposo y en la segunda con jugo prensado (bajo contenido de pulpa), por las razones que se explican en el apartado 5.1.2.

## **4.5 Pruebas definitivas**

### **4.5.1 Selección del preparado enzimático más adecuado**

Se buscó en el mercado nacional, tres preparados enzimáticos que cumplieran con las siguientes características: 1) no provenir de organismos genéticamente modificados, esto por la falta de información que se tiene sobre el tema y sus efectos sobre la salud del consumidor; 2) permitir un pedido mínimo aceptable según la producción prevista; 3) tener un costo bajo; 4) contar con un distribuidor a nivel nacional; (ver anexo AI) y que su aplicación permita obtener la mayor extracción posible de jugo de mora, en las condiciones que se tienen en la empresa procesadora de frutas y vegetales, en este caso se utilizaron preparados enzimáticos con actividades declaradas de celulasa, pectinasa y poligalacturonasa, se debe mencionar que el pedido mínimo de estos es de 25 kg..

Mediante un diseño irrestricto aleatorio se evaluaron cuatro tratamientos, tres tratamientos con los tres preparados enzimáticos elegidos más un tratamiento sin adición de enzima. Las variables respuesta fueron el rendimiento de extracción de jugo (ver apartado 4.7.7), el porcentaje de sólidos insolubles en suspensión y la turbidez.

Se preparó un lote homogéneo de mora como se describe en el punto 4.2 y se elaboró un jugo pulposo de la manera que se determinó como más adecuada en el punto 4.4.2 midiendo el porcentaje de sólidos insolubles en suspensión y la turbidez del jugo obtenido. El lote se dividió en 4 porciones iguales, cada proporción se utilizó en un tratamiento diferente.

Todos los tratamientos se llevaron a cabo durante un tiempo X y a una temperatura Y. Finalmente, la concentración del preparado utilizada fue igual para todos los tratamientos, excepto para el tratamiento sin enzima, esto con el fin de observar diferencias de actividad entre los preparados enzimáticos; se realizaron tres repeticiones de los tratamientos sobre muestras independientes. Con los resultados obtenidos, para las variables respuesta, se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) para cada variable respuesta, y los promedios fueron comparados utilizando una prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).

#### 4.5.2 Optimización del tratamiento enzimático (tiempo y concentración del preparado enzimático) para dos tipos de jugo de mora.

Con el preparado enzimático que se seleccionó como más adecuado mediante el procedimiento descrito en la sección 4.5.1, se realizó la optimización de 2 tratamientos, en el primero utilizando como materia prima jugo pulposo obtenido con la metodología descrita en el punto 4.4.2 y en el segundo utilizando como materia prima el jugo prensado (bajo contenido de pulpa), obtenido mediante la hidroprensa.

Para determinar las mejores condiciones de cada tratamiento se utilizó un diseño central compuesto rotativo (DCCR) con dos variables independientes y 5 niveles cada una, como se muestra en el cuadro II. El punto central de la concentración fue de  $C_0$  ppm de la enzima seleccionada, el punto menor fue  $C_{-\sqrt{2}}$  ppm y el mayor de  $C_{\sqrt{2}}$  ppm.

En cuanto al tiempo, el punto central fue a los  $t_0$  min, mientras que el punto mínimo fue a los  $t_{-\sqrt{2}}$  min y el máximo a los  $t_{\sqrt{2}}$  min, ya que corresponde al tiempo máximo para que se factible su aplicación por parte de la empresa. Las variables respuesta fueron la viscosidad y la turbidez.

**Cuadro III.** Variables y niveles a utilizar en el diseño central compuesto.

Factores	Niveles*				
	-1,414	-1	0	1	1,414
Concentración de enzima (ppm)	$C_{-\sqrt{2}}$	$C_{-1}$	$C_0$	$C_1$	$C_{\sqrt{2}}$
Tiempo de proceso (min)	$t_{-\sqrt{2}}$	$t_{-1}$	$t_0$	$t_1$	$t_{\sqrt{2}}$

\*donde  $C_{-\sqrt{2}} < C_{-1} < C_0 < C_1 < C_{\sqrt{2}}$  y  $t_{-\sqrt{2}} < t_{-1} < t_0 < t_1 < t_{\sqrt{2}}$

El diseño consta de 11 puntos experimentales: 4 puntos factoriales, 4 puntos axiales y 3 repeticiones del punto central. La matriz del DCCR y el orden en que se llevaron a cabo los tratamientos se presentan en el cuadro III.

**Cuadro IV.** Matriz del diseño central compuesto de dos factores y cinco niveles (puntos aleatorizados).

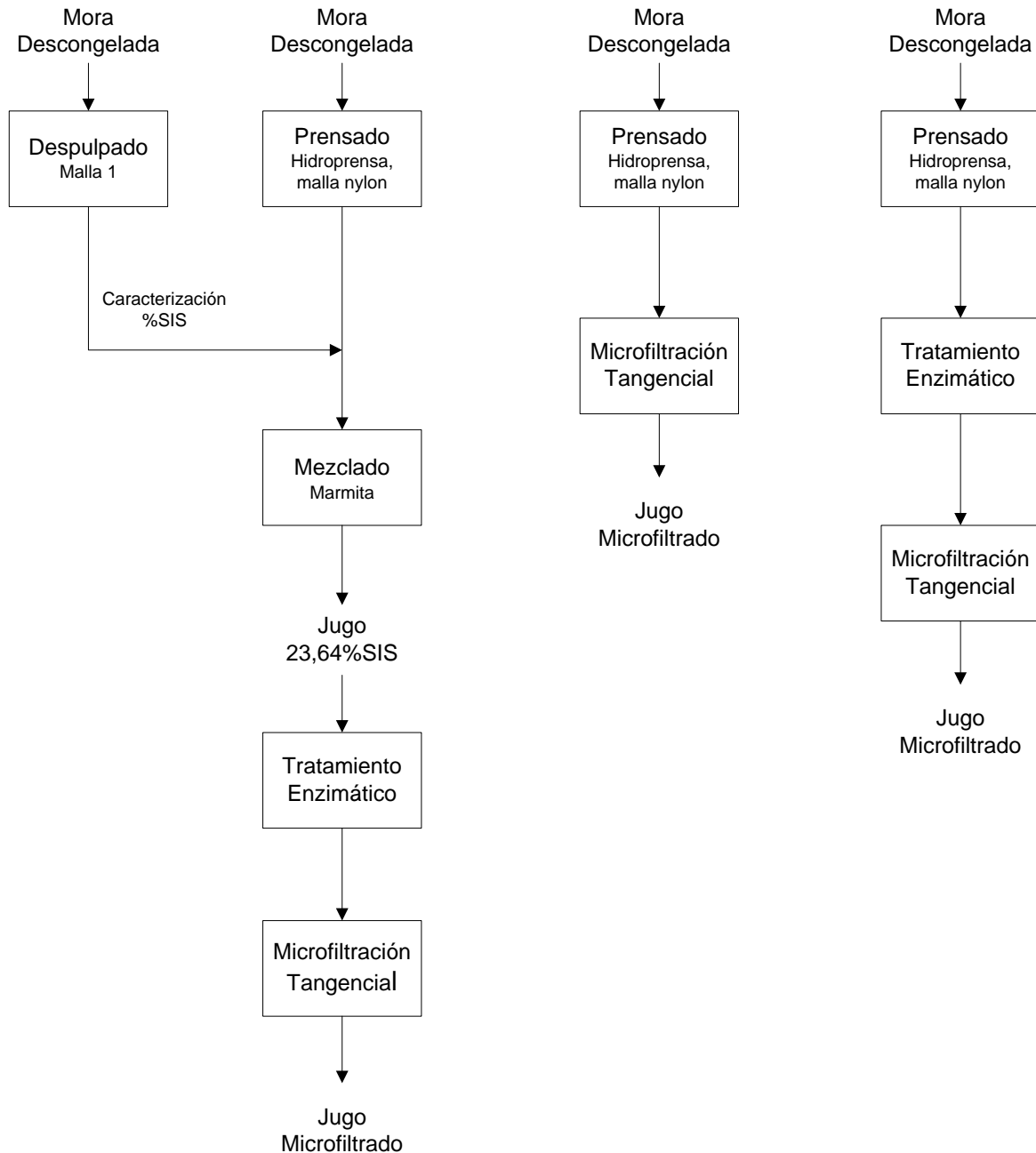
Ensayo	Factores			
	Concentración de enzima (ppm)		Tiempo de tratamiento (min)	
	Valores codificados	Valores no codificados	Valores codificados	Valores no codificados
1	0	$C_0$	0	$t_0$
2	0	$C_0$	0	$t_0$
3	1	$C_1$	1	$t_1$
4	0	$C_0$	1,414	$t_{v2}$
5	-1	$C_{-1}$	1	$t_1$
6	1,414	$C_{v2}$	0	$t_0$
7	-1,414	$C_{-v2}$	0	$t_0$
8	1	$C_1$	-1	$t_{-1}$
9	-1	$C_{-1}$	-1	$t_{-1}$
10	0	$C_0$	0	$t_0$
11	0	$C_0$	-1,414	$t_{-v2}$

Los resultados fueron procesados por medio del programa STASTICA 7 (Statsoft®, USA), para generar un modelo de superficie de respuesta a partir del cual se determinaron las condiciones óptimas teóricas. Con los resultados, obtenidos en las pruebas, se procedió a escoger las condiciones óptimas para el tratamiento enzimático del jugo de mora en cuanto a la concentración de enzima y el tiempo, utilizando como criterio la viscosidad y la turbidez.

Posteriormente, se realizó una verificación con las condiciones óptimas determinadas y se compararon los resultados experimentales obtenidos con los valores predichos en el modelo matemático, con un número igual de repeticiones igual al determinado para el punto central del diseño ( $n=3$ ).

#### **4.5.3 Determinación del proceso de obtención de jugo de mora más adecuado para alcanzar los flujos y rendimientos más altos en la microfiltración tangencial (MFT) a nivel piloto**

Se analizó el comportamiento del proceso de microfiltración tangencial al utilizar tres metodologías distintas de procesamiento como se describen a continuación en la figura 11, cada uno de los tratamientos se repitió dos veces.



**Figura 11.** Metodologías de procesamiento para producción de jugo microfiltrado de mora.

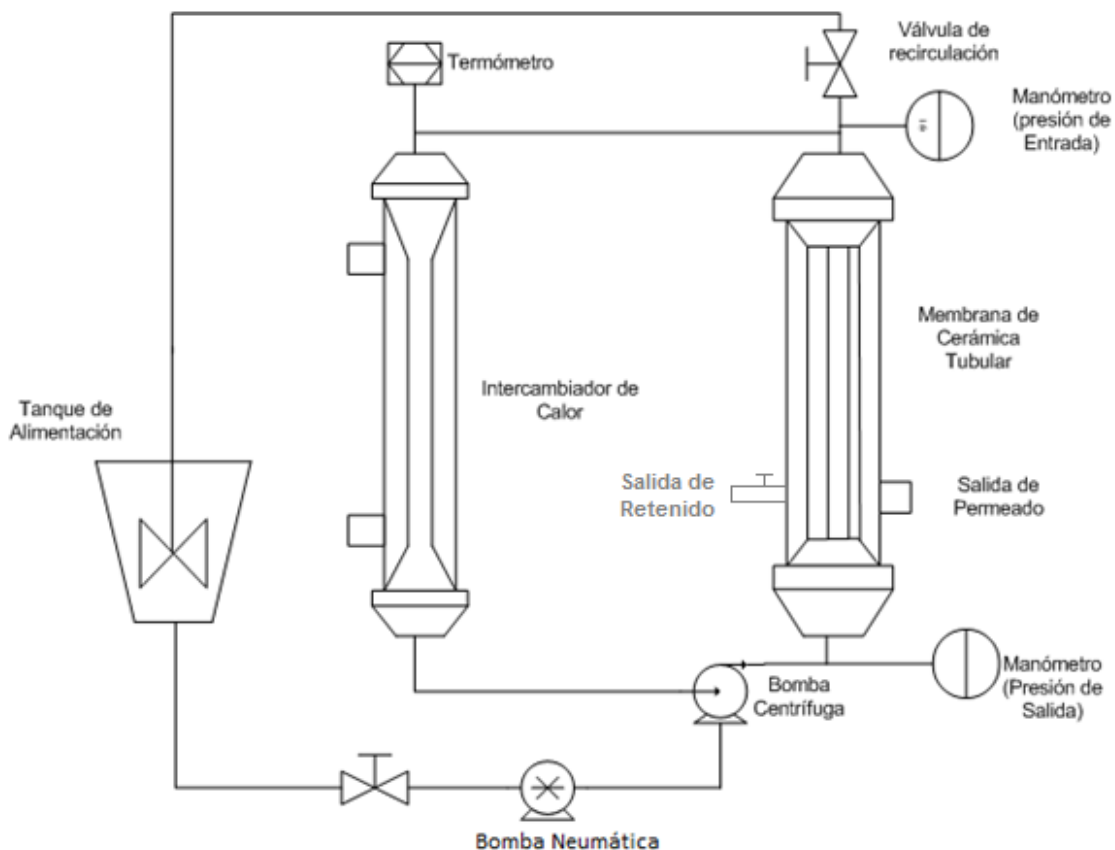
Se graficó minuto a minuto el flujo de permeado y el factor de reducción volumétrico (FRV), con el fin de seleccionar el proceso más promisorio para la producción de jugo microfiltrado de mora. Aparte, se comparó el flujo promedio de permeado obtenido de los tres tratamientos con respecto a un mismo valor de FRV.



Para todos los tratamientos se manejó la materia prima como se describe en el punto 4.2. Para el primer tratamiento se microfiltraron 30 L de jugo de alimentación, la proporción de la mezcla entre jugo pulposo y prensado se realizará para obtener un jugo con un 23,6 % de SIS, esta mezcla varía según el % SIS que se obtenga en el jugo pulposo, mientras que para los otros dos se utilizaron 50 L de jugo.

La microfiltración tangencial del jugo se realizó en modo concentración, es decir que no se extrajo el retenido durante el proceso hasta el final del mismo.

La unidad de microfiltración estaba compuesta (ver figura 12) por una membrana tubular de cerámica de alúmina Membralox (Pall Corporation, Estados Unidos) con un tamaño de poro de  $0,2 \mu\text{m}$ , una bomba centrífuga que da el flujo tangencial, una bomba neumática que provee la alimentación y la presión del sistema; para el control de la temperatura se contó con un intercambiador de calor, y el flujo de permeado se midió con un caudalímetro digital acoplado a la salida de permeado.



**Figura 12.** Diagrama del equipo de MFT piloto utilizado.

#### 4.5.4 Corroboración de la factibilidad técnica del proceso mediante ensayos de MFT de larga duración a escala piloto.

En esta etapa se realizó la microfiltración de 100 L de jugo de mora, mediante dos repeticiones, procesados mediante la metodología seleccionada en el punto 5.2.3. Estos ensayos fueron de larga duración; sin embargo, se utilizó la metodología aplicada por Montero (2008), en la cual en vez de recircular el retenido con jugo fresco, se microfiltró hasta llegar a un FRV de 20 y luego se empezó a recircular el permeado, agregándolo al tanque de alimentación, hasta completar un proceso de 5 h. Durante todo el proceso se mantuvo una temperatura de Y °C y una presión transmembranaria promedio de Z bar.

Al igual que en el punto 5.2.3, se graficó el flujo de permeado y el FRV minuto a minuto. Aparte se tomaron muestras de materia prima, del permeado cuando se llegó a un FRV 20 y cuando se terminó el proceso, y del retenido cuando se llegó a un FRV de 20 y al final del proceso. A estas muestras se les midió el contenido de sólidos solubles, el pH, la turbidez y la viscosidad. El equipo fue el mismo que se describió en el punto 4.5.3.

#### 4.6 Análisis estadístico

Los resultados de los puntos descritos en los apartados 4.4.1 y 4.4.2 (pruebas preliminares) se analizaron mediante un análisis de varianza (ANDEVA) para cada variable respuesta y los promedios se compararon con una prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ). Esto también se aplicó para el punto 4.5.1, referente la selección del preparado enzimático más adecuado.

Para la sección 4.5.2, relacionada con la optimización del tratamiento enzimático, cada una de las variables independientes fueron codificadas como  $x_1$  y  $x_2$ , respectivamente, cada una con 5 niveles:  $-\sqrt{2}$ ,  $-1$ ,  $0$ ,  $1$ ,  $\sqrt{2}$ . Las variables dependientes ( $y$ ) fueron expresadas individualmente como una función de las variables independientes conocida como función de respuesta (Rai *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2006; Sin *et al.*, 2006; Liew Abdullah *et al.*, 2007; Télesphore & He, 2009). La varianza de cada factor evaluado fue dividida en componentes lineales, cuadráticos y su interacción, y se representaron como una función polinomial de segundo orden, de la siguiente forma:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{12}x_1x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 \quad (\text{Ecuación 5})$$

Posteriormente, se obtuvo la significancia de cada factor ( $p < 0,05$  a  $0,001$  según el caso), así como el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) y la probabilidad de cada modelo ( $p$ )

generado para cada variable respuesta (y). Para los modelos cuyos indicadores hayan sido satisfactorios en cuanto a  $R^2$  y p, se generó una superficie de respuesta con el comportamiento de la variable respuesta con respecto a los factores significativos, en el rango de estudio, para poder realizar la selección de un punto óptimo. Para este análisis se utilizó el programa Statistica 7 (Statsoft®, Estados Unidos).

Finalmente, se realizó una verificación de los resultados haciendo un ensayo experimental del punto obtenido como óptimo de acuerdo a la metodología anterior. El valor esperado se comparó con el obtenido experimentalmente, con su respectivo intervalo de confianza, y una prueba t de Student (Liyana-Patharina & Shahidi, 2005).

Para la sección 4.5.3, el promedio de los flujos de permeado a rangos específicos de FRV se analizaron mediante un ANDEVA, y se comparó cada uno de ellos dentro de su respectivo rango mediante una prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Los resultados de los apartados 5.1.1, 5.1.2, 5.2.1, 5.2.4, se reportan junto con un intervalo de confianza de un 95% y cada uno fue realizado por triplicado. En los resultados del apartado 5.2.3 las mediciones se reportan junto a un intervalo de confianza de 95% y se realizaron por duplicado.

## **4.7 Métodos de análisis**

### **4.7.1 Determinación del porcentaje de sólidos insolubles en suspensión (SIS)**

Se adaptó el método utilizado por Montero (2008), se midió la masa de 50 mL de jugo y se colocó en una centrífuga Hermle Z300 (Labnet International Inc, Estados Unidos) a  $2200 \times g$ , con tiempo de centrifugación de 15 min, expresando el resultado como porcentaje (m/m) de sólidos insolubles.

$$\% SIS = \frac{\text{masa SIS (g)}}{\text{masa de muestra (g)}} \times 100$$

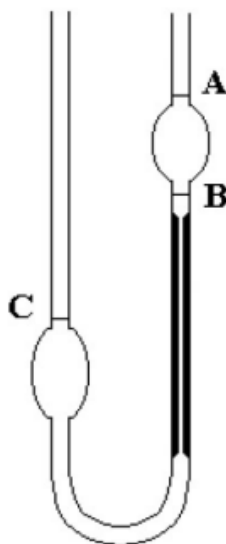
(Ecuación 6)

#### 4.7.2 Determinación de la turbidez

Se midió la turbidez de las muestras con un turbidímetro modelo 2100 AN (Hach, Estados Unidos), agitando la muestra levemente y tomando la lectura a los 30 s. Los valores se expresan en NTU (*Nephelometric Turbidity Units*).

#### 4.7.3 Determinación de la viscosidad utilizando el viscosímetro de Ostwald

La viscosidad se determinó de manera relativa a un líquido de viscosidad conocida, a una temperatura de 20 °C. Primero se mide la densidad de la muestra, midiendo la masa de un mililitro exacto del líquido muestra 5 veces en una balanza analítica para obtener su densidad. Luego se llena el viscosímetro, con el líquido de referencia (agua) por el extremo en donde el bulbo se encuentra en la parte inferior y se llena hasta el punto C, dejando burbujas de aire (ver figura 13). Luego mediante el uso de una bomba de succión se succiona el líquido hasta más arriba del punto A, y se deja fluir, y se mide el tiempo en que el menisco tarda en pasar del punto A al punto B, esto se hace por triplicado. Posteriormente, se repite la misma operación con la muestra respectiva. Todas estas operaciones se realizan con los líquidos a una misma temperatura, en este caso de 20 °C, para estar a una temperatura similar al laboratorio Química de la Escuela de Tecnología de Alimentos.



**Figura 13.** Viscosímetro de Ostwald.

Luego se determina la viscosidad mediante la siguiente ecuación (Painter & Coleman, 2009):

$$\eta = \frac{\eta_0 \cdot \rho \cdot t}{\rho_0 \cdot t_0}$$

(Ecuación 7)

Donde  $\eta$  es la viscosidad de la muestra,  $\eta_0$  la viscosidad del agua a 20 °C,  $\rho$  la densidad de la muestra a 20 °C,  $\rho_0$  la densidad del agua a 20 °C,  $t$  es el tiempo en segundos que tarda en pasar la muestra del punto A al B del viscosímetro y  $t_0$  el tiempo que tarda el agua. Esta medición se realizó solamente para aquellos jugos con menos del 1 % de SIS.

#### **4.7.4 Medición de la viscosidad utilizando un viscosímetro rotacional**

En esta medición se utilizó un viscosímetro rotacional que funciona mediante el principio del torque requerido para mover un objeto, un husillo, en un medio líquido. La viscosidad de este líquido será proporcional al torque requerido.

Se utilizó un viscosímetro rotacional modelo RVT (Brookfield Engineering Laboratories, Estados Unidos); en un recipiente adecuado se colocaron 350 mL de muestra y se midió la viscosidad de las muestras de jugo pulposo con más de 10 % SIS, a 50 rpm con el huso número 2, por 30 s, a 20°C.

#### **4.7.5 Determinación de los sólidos solubles (°Brix)**

Se utilizó un refractómetro de Abbé 1T (Atago, Japón) con control de temperatura según el método 932.12 de AOAC (1999).

#### **4.7.6 Determinación del pH**

Se determinó según el método 981.12 de AOAC (1999).

#### **4.7.7 Determinación del rendimiento de extracción a nivel de laboratorio**

Se realizó adaptando la metodología utilizada por Sharma *et al.* (2005) y Soto (2010), con un analizador de textura TA.XT Plus (Stable Micro Systems, Reino Unido) con una celda

de 10 cm de diámetro para comprimir la muestra. Se colocó la muestra de 150 g en una pequeña manta y ésta a su vez en un recipiente perforado que permitía la salida del líquido. Luego se procedió a realizar el prensado de la muestra en el analizador de textura TA.XT Plus aplicando una fuerza de 50 kg durante 2 min. El jugo obtenido fue recolectado en recipiente y pesado. Se determinó el rendimiento de extracción mediante la ecuación 8.

$$\% \text{ de Rendimiento} = \frac{\text{Masa de muestra} - \text{Masa de torta prensado}}{\text{Masa de muestra}} \times 100 \quad (\text{Ecuación 8})$$

#### 4.7.8 Determinación de color

El color fue evaluado utilizando un colorímetro Hunterlab Flex, modelo 45/0 (HunterLab, Estados Unidos). Para la medición del color se utilizó la escala CIELab, que expresa el color por medio de los parámetros  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ . El parámetro  $L^*$  representa la luminosidad de la muestra, el rango de este valor va desde 0 (color blanco) hasta 100 (color negro); el parámetro  $a^*$  mide la dimensión cromática, desde rojo (valores positivos) a verde (valores negativos), en el punto cero el color es gris; finalmente, el parámetro  $b^*$  que mide la dimensión cromática de amarillo (valores positivos) a azul (valores negativos).

El valor DE se calculó utilizando como referencia los valores de  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  del jugo prensado inicial y se utilizó la siguiente ecuación:

$$DE = \sqrt{(L_o^* - L_i^*)^2 + (a_o^* - a_i^*)^2 + (b_o^* - b_i^*)^2} \quad (\text{Ecuación 9})$$

Donde los parámetros con subíndice 0 son los datos del jugo prensado y los de subíndice i corresponden a los de los distintos jugos.

Se colocaron 30 mL de muestra en el equipo, previamente calibrado, utilizando el fondo negro y un estándar de calibración; el equipo mide cada uno de los parámetros automáticamente.

#### 4.7.9 Rendimiento de las operaciones

El porcentaje de rendimiento de las operaciones se calculó como una relación de producto obtenido con respecto a la materia prima utilizada.

#### 4.7.10 Costos económicos

Se realizó un análisis de costos para los procedimientos descritos en los apartados 4.5.3 y 4.5.4., para ambos en el análisis de costos se tomaron en cuenta los siguientes componentes, mismos que fueron tomados en cuenta por Vaillant *et al.* (2001): el costo de la materia prima, costo del preparado enzimático, depreciación del equipo, el costo energético y las horas de trabajo del operario. Se expresaron los costos de cada tratamiento en colones·m<sup>2</sup>/litro de permeado, para el apartado 4.5.3 se calcularon los costos a varios valores de FRV (6, 7, 8 y 9) para evaluar los flujos, y costo en cada caso y para el apartado 4.5.4 se hizo a un FRV 18,46, que fue al valor donde se mantuvo el FRV constante. Para calcular los costos se procedió de la siguiente forma:

- Se calcularon los costos para una jornada de trabajo de 8 horas, restando 3 horas por cada ciclo de lavado según cada tratamiento, obteniendo así las horas productivas, cabe resaltar que se consideraron de esta forma los tiempos de lavado por la tecnología actual que se tiene para MFT sin embargo existen equipos automatizados que podrían realizar el lavado luego de la jornada laboral para tener un mejor aprovechamiento del tiempo.
- El volumen en litros de permeado por metro cuadrado se tomaron con los datos de la figura 19 (sección 5.2.3) para el apartado 4.5.3 para cada valor de FRV y con el promedio de los flujos a un FRV de 18,46 en el caso del apartado 4.5.4. Según cada tratamiento, se escogió el valor de flujo de permeado menor; este valor se multiplicó por las horas productivas para obtener litros por m<sup>2</sup>, a este valor se le llamará (F).
- Con cada valor de FRV se determinó el rendimiento de la operación de microfiltración tangencial y se calculó el jugo inicial requerido en cada tratamiento. Este valor se multiplicó por la concentración de preparado enzimático utilizado según el tratamiento y el costo de dicho preparado, el cual fue el seleccionado en el apartado 4.5.1. De acuerdo al proveedor nacional dicho valor es de 11913,97 colones por kilogramo. De esta forma, se obtiene el costo que tiene el preparado enzimático para cada caso, a este valor se le llamará (B).
- Con la cantidad del jugo inicial requerido para cada tratamiento y utilizando el porcentaje de extracción de jugo que se obtuvo en cada caso, se obtiene la cantidad de materia prima requerida por cada tratamiento. Este valor se multiplica por el precio de venta de la mora según APROCAM para enero del 2014 que es

1000 colones el kilogramo, obteniendo así el costo de la materia prima, a este valor se le llamará (A).

- La depreciación se calculó para un m<sup>2</sup> de membrana, que es la superficie disponible en la planta procesadora de frutas y vegetales. El costo se calculó de igual forma que Vaillant *et al.* (2001), tomándose \$10 000 por metro cuadrado de membrana como inversión inicial (se utilizó el tipo de cambio del 15 de mayo del 2014 de 560,09 colones por dólar) y un período de depreciación de 3 años, a este valor se le llamará (C).
- El consumo de energía se cálculo de acuerdo al supuesto de Vaillant *et al.* (2001) de tres kWh por metro cuadrado de membrana, tomándose el costo del kWh, de 88 colones de acuerdo a lo establecido por el Instituto Costarricense de Electricidad al 24 marzo del 2014, este valor se multiplica por 8 horas, a este valor se le llamará (D).
- Finalmente, el costo de la hora de trabajo se estableció como el salario mínimo de un operario calificado según el Ministerio de Trabajo y Seguridad Social para el primer semestre del 2014 que es de 9926,53 colones por jornada laboral de 8 horas (E).

A continuación se presentan los datos de manera resumida los datos utilizados, en el cuadro IV.

**Cuadro V.** Supuestos y costos para análisis económico de cada uno de los procesos de obtención de jugo clarificado de mora estudiados.

Supuesto	Tipo de proceso			
	23,6% <b>SIS</b>	<b>PSE</b>	<b>PCE</b>	<b>Larga duración</b>
Costo materia prima (colones/kg)	1000	1000	1000	1000
Costo de la energía (colones/kW.h)	58,08	58,08	58,08	58,08
Valor de la hora hombre (colones/hora)	1240,82	1240,82	1240,82	1240,82
Costo del preparado enzimático (colones/kg)	11914	11914	11914	11914
Inversión por superficie de membrana (\$/m <sup>2</sup> )	10 000	10 000	10 000	10000
Cantidad de preparado (ppm)	250	0	250	250
Número de lavados requeridos	2	1	1	1
Horas productivas	2	5	5	5
Rendimiento de extracción de jugo (%)	69%	62%	65%	61%

SIS: sólidos insolubles en suspensión; PSE: Proceso sin tratamiento enzimático; PCE: Proceso con tratamiento enzimático.



El costo de un litro de jugo de mora obtenido se calcula mediante la ecuación 10:

$$\text{Costo} \left( \frac{\text{colones} \cdot \text{m}^2}{\text{litro}} \right) = \frac{A(\text{colones}) + B(\text{colones}) + C(\text{colones}) + D(\text{colones}) + E(\text{colones})}{F\left(\frac{\text{l}}{\text{m}^2}\right)}$$

(Ecuación 10)

Donde A es el costo de la materia prima, B el costo del preparado enzimático, C la depreciación del equipo, D el costo de la energía y E el costo de la mano de obra, todo para una jornada de 8 horas.

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Pruebas preliminares

#### 5.1.1 Caracterización del proceso y del jugo realizado en la empresa

Aunque no se procesa el producto a nivel comercial, es necesario hacer una evaluación del equipo de microfiltración tangencial disponible y las características de los productos que se obtienen en la empresa, con el fin de tener un punto de partida para optimizar el proceso de elaboración del jugo.

En el cuadro V, se muestran las etapas del proceso y los resultados de varias mediciones hechas a las muestras tomadas luego de cada etapa; en este caso son de particular interés las características del jugo prensado ya que da los parámetros para la materia prima que se obtiene de la extracción del jugo de mora en la empresa. Con estos parámetros se debe trabajar en los ensayos posteriores a nivel de planta piloto para que los resultados obtenidos puedan ser aplicados de nuevo en la empresa procesadora de frutas y vegetales. De los parámetros medidos los más importantes con base en su efecto sobre un eventual tratamiento de microfiltración tangencial son la turbidez y el porcentaje de sólidos insolubles en suspensión.

**Cuadro VI.** Turbidez, sólidos insolubles en suspensión (SIS), sólidos solubles y color de los jugos obtenidos en diferentes etapas del procesamiento de jugo microfiltrado de mora en la empresa.

Muestra	Jugo prensado	Jugo tratado enzimáticamente	Permeado	Retenido	
<b>Turbidez (NTU)</b>	18873 ± 1080 <sup>b</sup>	14280 ± 3128 <sup>b</sup>	12,6 ± 0,7 <sup>c</sup>	58013 ± 2497 <sup>a</sup>	
<b>% SIS</b>	23,6 ± 0,8 <sup>b</sup>	18,3 ± 1,5 <sup>b</sup>	NM	39,1 ± 6,4 <sup>a</sup>	
<b>Sólidos solubles</b>	10,0 ± 0,0 <sup>b</sup>	10,0 ± 0,0 <sup>b</sup>	8,8 ± 0,3 <sup>c</sup>	12,3 ± 0,7 <sup>a</sup>	
<b>Color</b>	<b>L*</b>	8,42 ± 0,05 <sup>b</sup>	7,28 ± 0,03 <sup>c</sup>	0,21 ± 0,02 <sup>d</sup>	15,89 ± 0,04 <sup>a</sup>
	<b>a*</b>	27,86 ± 0,04 <sup>b</sup>	25,8 ± 0,2 <sup>c</sup>	0,23 ± 0,02 <sup>d</sup>	31,24 ± 0,06 <sup>a</sup>
	<b>b*</b>	9,47 ± 0,03 <sup>b</sup>	8,16 ± 0,04 <sup>c</sup>	0,02 ± 0,01 <sup>d</sup>	11,42 ± 0,03 <sup>a</sup>
	<b>DE</b>	Referencia	2,71 ± 0,29 <sup>a</sup>	30,34 ± 0,04 <sup>b</sup>	8,43 ± 0,11 <sup>c</sup>
<b>pH</b>	2,64 ± 0,00 <sup>c</sup>	2,64 ± 0,01 <sup>c</sup>	2,66 ± 0,01 <sup>b</sup>	2,68 ± 0,01 <sup>a</sup>	

Nota: En una misma fila valores con letras diferentes indican una diferencia significativa según la prueba de Tukey ( $p \leq 0,05$ ), los resultados se presentan con un intervalo de confianza de un 95% ( $n=3$ ). NM, no se midió.

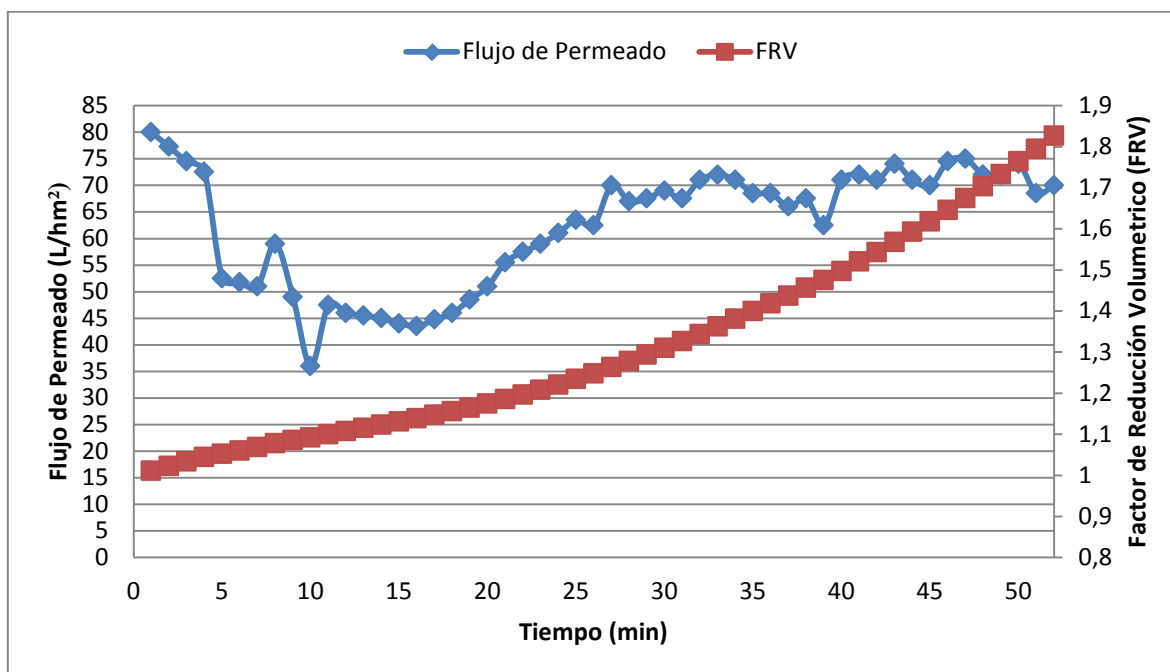
El parámetro de la turbidez es importante ya que este tiene un efecto sobre el flujo de permeado en un eventual tratamiento de MFT; conforme se tiene un valor más bajo de turbidez, en el producto de alimentación, los flujos de permeado serán mayores, mientras que valores de turbidez más altos darán flujos de permeado menores, cuando se comparan a un mismo FRV (Vaillant *et al.*, 2008), por lo que se desea obtener un valor lo más bajo posible de este parámetro. Específicamente para la mora, se puede controlar la turbidez de la materia prima mediante la metodología de extracción de jugo, se puede obtener una turbidez menor utilizando prensados por tandas (discontinuos) que prensados continuos (como tornillo sin fin) o despulpados (Soto, 2010). Durante el ensayo realizado en la empresa, se evaluó el cambio de la turbidez durante el proceso, para observar en cuales condiciones se llevaba a cabo la MFT. En este caso, solo se realizaron dos operaciones antes de la MFT y, como se muestra en el cuadro V, no se presentan diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre la turbidez del jugo que se obtiene del prensado con respecto a la que se obtiene luego del tratamiento enzimático. Este comportamiento no se esperaba ya que de manera general durante el tratamiento enzimático hay un aumento en la turbidez por la generación de una gran cantidad de residuos de polisacáridos, lo que a su vez aumenta la capacidad del jugo para refractar la luz (Vaillant *et al.*, 2008). Este comportamiento se podría explicar por los valores obtenidos de NTU ya que están en el orden de las diez mil unidades, esto afecta significativamente la precisión del equipo ya que en mediciones de este orden es de  $\pm 10\%$  (Hach Company, 2013), esto junto al hecho de que se debe hacer una dilución para hacer la medición.

La medición de sólidos insolubles en suspensión (% SIS), contabiliza sustancias como pectinas insolubles y materiales de celulosa que son los principales agentes que obstruyen la membrana (Ushikubo *et al.*, 2007). También, en el cuadro V, se puede ver el cambio que se va dando en cuanto al % de SIS en las muestras; aunque no se obtiene una diferencia significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre el jugo inicial y el tratado enzimáticamente, se ve una disminución en el valor de % de SIS. No fue posible medir el valor para el jugo permeado ya que este presenta un contenido de SIS menor al 1 %, pero sí se observó cómo se acumularon los sólidos en el retenido superando la cantidad del jugo inicial, lo cual es el comportamiento esperado para este proceso (Vaillant *et al.*, 2001).

En cuanto al parámetro del color, estadísticamente se tiene una diferencia entre el jugo prensado, el tratado enzimáticamente, el retenido y el permeado ( $p \leq 0,05$ ); sin embargo, entre el jugo prensado y el tratado enzimáticamente esta es muy pequeña para que sea posible distinguirlos visualmente, según Obón *et al.* (2009) para que las personas puedan distinguir dos colores a simple vista la distancia entre ambos en la escala tridimensional CIELab debe de ser mayor que 1,5. En el caso del permeado y el retenido. Sí es posible diferenciarlos visualmente, lo cual se debe a que existe una retención de compuestos coloreados en el retenido por parte de los componentes de la pared celular, como las antocianinas (Pacheco-Palencia *et al.*, 2007; Acosta-Montoya *et al.*, 2010), que quedan en el retenido.

En este caso se estableció como prioridad obtener a nivel de planta piloto un jugo que tuviese un valor similar de % SIS al obtenido en la planta industrial para poder realizar los ensayos, por lo que se consideró como valor base  $23,6 \pm 0,8$  % de sólidos insolubles en suspensión.

También, se realizó un ensayo en el cual se microfiltró el jugo obtenido luego de realizar un tratamiento con un preparado enzimático comercial de pectinasas durante 1 h, con el fin de ver el estado general y el funcionamiento del equipo de la empresa.



**Figura 14.** Flujo de permeado y FRV durante la microfiltración ( $T=Y^{\circ}C$ ,  $P_{tm}=Z$  bar) de jugo de mora tratado enzimáticamente utilizando el equipo de la empresa.

Como se puede ver, en la figura 14, el flujo de permeado se estabilizó alrededor de los 70 L/h·m<sup>2</sup> partiendo de una materia prima con un 18,32 % de SIS lo cual es normal para mora en condiciones similares (Vaillant *et al.*, 2001). La permeabilidad de la membrana era adecuada, el problema que se encontró en este equipo fue una fuga en el sello de la bomba centrífuga, lo cual se manifestó en el bajo rendimiento obtenido por la salida de jugo debido a esta fuga, obteniéndose un FRV de 1,83, consumiendo 119,60 kg de materia prima, lo que equivale a un rendimiento de apenas un 45,25%, si se realiza un cálculo teórico con los flujos obtenidos y el volumen muerto del equipo que es de alrededor de 9 L, a los 52 min de proceso se debió haber obtenido un FRV de 4,61, lo que correspondería a un rendimiento en ese momento de un 78,31%. Por otro lado, también se logró determinar que la mayor presión transmembranaria que se obtiene con las bombas del equipo de la planta procesadora de frutas y vegetales es de alrededor 2 bar, por lo que se utilizó este valor para los ensayos a nivel piloto, ya que también esta es la presión más baja que se logra obtener en el equipo piloto. Estas observaciones fueron informadas a la empresa para corregir y tener el equipo en óptimas condiciones. Finalmente, se midió el rendimiento del proceso con las condiciones de proceso que se tenían inicialmente.

**Cuadro VII.** Rendimiento de las operaciones individuales y el global del proceso de extracción y microfiltración de jugo de mora en la empresa.

Operación	Rendimiento (%)
Prensado (tornillo sin fin)	70,35
Microfiltración tangencial	45,25
Rendimiento global (%)	31,84

Como se puede ver en el cuadro VI, la operación de extracción del jugo mediante una prensa de tornillo tiene un rendimiento del 70,35 % m/m, el cual corresponde a valores más altos que los obtenidos por Montero (2008), utilizando otros métodos de extracción de jugo de mora; pero la prensa de tornillo da una mayor cantidad de sólidos insolubles en suspensión en el jugo. Por otra parte, la operación de microfiltración tangencial tuvo un rendimiento de 45,25 % m/m, lo cual fue muy bajo por las razones mencionadas anteriormente, lo que da un rendimiento global del proceso de un 31,84 %. Esto indica

que se deben hacer mejoras en la operación básica del equipo, aparte de la optimización del tratamiento que es el objetivo de este trabajo.

### 5.1.2 Elaboración del jugo pulposo en la planta piloto del CITA

Con la información que se obtuvo anteriormente se procedió a definir un tratamiento de extracción de jugo con el que fuese posible obtener un jugo similar al obtenido en la empresa, tomando como valor de referencia los sólidos insolubles en suspensión, para realizar las pruebas posteriores. En el cuadro VII se muestran, para los tratamientos, los valores de sólidos insolubles en suspensión obtenidos, así como el rendimiento y otras observaciones de cada proceso.

**Cuadro VIII.** Porcentaje de rendimiento y sólidos en suspensión de jugos de mora obtenidos mediante varios métodos de extracción.

Parámetros	Tratamientos					
	Despulpado (malla 1)	Despulpado (malla 1→ malla 2)	Despulpado (malla 1→ malla 2→ malla 3)	Prensa de tornillo (malla T1)	Prensa de tornillo (mallas T1→ T2)	Hidroprensa (Malla nylon)
Rendimiento (%)	70,5±1,4 <sup>a</sup>	59,1±8,1 <sup>b</sup>	45,5±1,5 <sup>c</sup>	NM	N/A	64,8±2,7 <sup>ab</sup>
Sólidos Insolubles en Suspensión (%)	45,5±5,6 <sup>a</sup>	26,2±6,3 <sup>b</sup>	16,1±0,3 <sup>b</sup>	33,7±1,5 <sup>ab</sup>	31,5±1,2 <sup>ab</sup>	NM
Observación	1 Etapa	2 Etapas	3 Etapas	1 Etapa, se atasca	2 Etapas, se atasca	1 Etapa

Nota: en una misma fila valores con letras diferentes indican una diferencia significativa según la prueba de Tukey ( $p \leq 0,05$ ), los resultados se presentan con un intervalo de confianza de un 95% ( $n=3$ ). NM: no se midió

Uno de los factores más importantes a considerar es que la extracción de jugo debe ser lo más rápida posible para minimizar al máximo la oxidación por las propias enzimas presentes en el jugo (McLellan & Padilla-Zakour, 2005), de ahí; que es importante considerar el número de etapas de extracción.

En los tres primeros tratamientos se aplicó un despulpado. En esta operación se da una mínima fuerza de compresión y una mayor fuerza de cizalla, las cuales rompen las estructuras vegetales para formar una sola masa que pasará por una malla de retención con un tamaño fijo y esto hace que los jugos obtenidos de esta forma tengan una mayor cantidad de sólidos en suspensión. Los tratamientos con despulpado se realizaron de tres formas distintas, comenzando en una sola etapa (Malla 1), luego en dos etapas (Malla 1 y Malla 2) y finalmente con tres etapas, pasando el jugo por tres mallas (Malla 1, Malla 2 y

Malla 3). Como se puede observar en cuadro VII, entre mayor es el número de etapas menor es el porcentaje de SIS que se obtiene en el jugo, ya que entre cada etapa hay una cantidad de semillas y sólidos que se retienen al no pasar por la malla, por lo que al reducir de manera progresiva el tamaño de apertura de la malla debe ser menor el tamaño de partícula que pasa por ella. Sin embargo, durante las pruebas se notó una gran variabilidad en los datos obtenidos de % SIS, por ello solo se obtuvo diferencia significativa ( $p \leq 0,05$ ) con el despulpado de una sola etapa, que presenta una mayor cantidad de sólidos insolubles en suspensión con respecto a los otros dos procesos realizados.

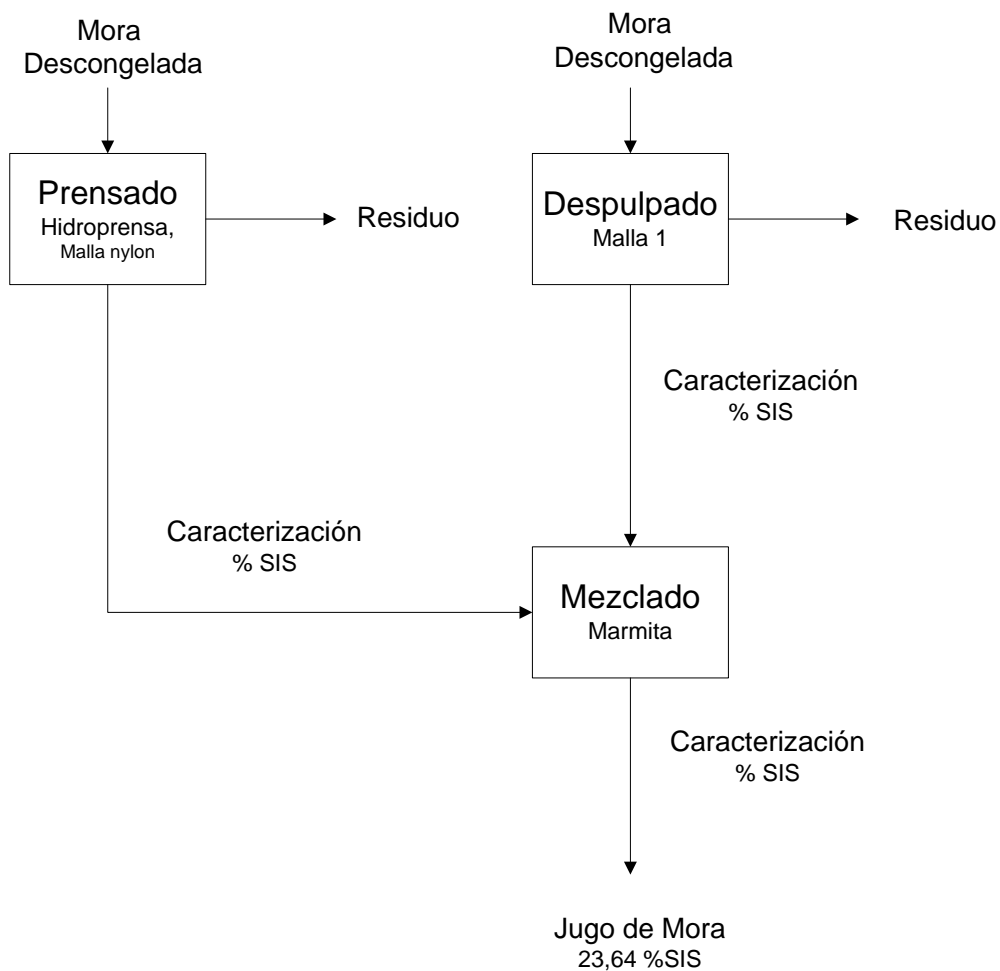
Con respecto al rendimiento, entre más etapas se aplican al proceso, menor será su valor; esto se puede observar en los tres primeros tratamientos, obteniéndose una diferencia significativa ( $p \leq 0,05$ ), en el mayor rendimiento que corresponde al despulpado de una sola etapa.

Luego se utilizó una prensa de tornillo; este es otro medio de extracción de jugo en el cual se pasa la materia prima en un tornillo sin fin, el cual está cubierto por una malla ubicada a corta distancia de éste, lo que permite la desintegración del tejido vegetal para obtener el jugo (McLellan & Padilla-Zakour, 2005). En este caso se realizaron dos tipos de proceso, uno en una sola etapa (Malla T1) y otro en dos etapas, (Malla T1 y Malla T2). En este caso no se pudo determinar el rendimiento de las operaciones ya que las prensas tendían a trabarse al llegar a cierta presión; en ambos casos se obtuvieron jugos con alrededor de un 30 % de SIS, los cuales no fueron significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ ) a los obtenidos mediante el despulpado.

También, se utilizó la hidroprensa para la extracción del jugo. Este equipo consiste en un neumático de forma cilíndrica rodeado de una malla de mayor diámetro con una manta. La principal fuerza en el prensado es la compresión que rompe las estructuras vegetales reteniendo la mayor cantidad de sólidos dentro de la manta (Montero, 2008). En este caso al ser el tamaño de apertura de la manta mucho menor que las de los orificios de las mallas utilizadas en los otros métodos de extracción, se obtiene un jugo con menos del 1% de SIS. El rendimiento del prensado con hidroprensa no es significativamente diferente ( $p \leq 0,05$ ) al del despulpado en una o dos etapas, pero sí es menor al obtenido con una prensa hidráulica, el cual es de alrededor de un 70 % (Montero, 2008). Pero con

la hidroprensa las tandas pueden ser de hasta 35 kg de mora y el tiempo de prensado es menor, por lo que se sacrifica el rendimiento por una mayor productividad en la operación.

Finalmente, luego de ver las opciones disponibles para la extracción del jugo, se obtiene una cantidad muy similar de SIS con respecto al jugo extraído en la empresa al emplear el despulpado en dos etapas. Sin embargo, esta operación tiene muchas variables que son difíciles de controlar como la alimentación, lo cual puede variar el contenido de sólidos insolubles deseados, por lo que, con el fin de garantizar que la obtención de un jugo similar para las pruebas restantes, se diseñó el proceso descrito a continuación, en la figura 15.



**Figura 15.** Flujo de proceso a utilizar para la obtención de jugo de mora con un 23,6 % de sólidos insolubles en suspensión.



Como se puede ver en la figura 15, se decidió elaborar un despulpado simple dónde el jugo pulposo obtenido se diluye con jugo obtenido con la hidroprensa para ajustar los sólidos insolubles en suspensión al valor deseado. En este caso, se prefiere aplicar estas operaciones porque son las que tienen un rendimiento más alto y se realizan en una sola etapa, lo que reduce el tiempo de proceso al poderse llevar a cabo de manera simultánea; además, se garantiza la obtención de una materia prima con el porcentaje de SIS deseado. Por otra parte, se decidió hacer paralelamente el estudio de la optimización de obtención de jugo clarificado utilizando la hidroprensa para la extracción, como alternativa a la prensa de tornillo continua de la empresa, debido a lo promisorio que se ve este método debido a la baja cantidad de sólidos insolubles en suspensión que se obtienen, así como a las facilidades de uso que este equipo presenta y la disponibilidad de modelos en el mercado con una mayor capacidad de procesamiento.

### 5.1.3 Pruebas preliminares para la optimización del tratamiento enzimático del jugo pulposo de mora

Se realizó un ensayo previo a la optimización de las condiciones para efectuar el tratamiento enzimático, por lo que se evaluó el efecto sobre las variables respuesta de interés de los puntos axiales del diseño experimental propuesto; esto se hizo dos veces, tanto para el jugo prensado con la hidroprensa (Cuadro VIII) como para el jugo pulposo de 23,64 % SIS (Cuadro IX).

En el cuadro VIII se observa el efecto de las condiciones de los puntos axiales del diseño experimental para jugo prensado sobre las variables respuesta turbidez y viscosidad.

**Cuadro IX.** Valores de viscosidad y turbidez obtenidos para las muestras de jugo de mora prensado con hidroprensa con distintos tratamientos enzimáticos utilizando el preparado enzimático A, a una temperatura de Y °C.

Parámetro	Tratamientos			
	C <sub>0</sub> ppm-t <sub>√2</sub> min	C <sub>√2</sub> ppm- t <sub>0</sub> min	C <sub>0</sub> ppm- t <sub>√2</sub> min	C <sub>√2</sub> ppm- t <sub>0</sub> min
Viscosidad (cP)	1,28 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,30 ± 0,01 <sup>b</sup>	1,33 ± 0,02 <sup>c</sup>	1,45 ± 0,00 <sup>d</sup>
Turbidez (NTU)	302 ± 39 <sup>b</sup>	268 ± 22 <sup>ab</sup>	247 ± 18 <sup>a</sup>	313 ± 10 <sup>b</sup>

Nota: En una misma fila valores con letras diferentes indican una diferencia significativa según la prueba de Tukey ( $p \leq 0,05$ ), los resultados se presentan con un intervalo de confianza de un 95% (n=3), las mediciones de viscosidad se realizaron a 20 °C.

Hay una diferencia significativa entre cada uno de los puntos axiales en cuanto a viscosidad, lo que indica que esta variable es de utilidad para observar las diferencias en

el modelo, en los rangos propuestos de concentración de preparado enzimático y tiempo de maceración.

Por otra parte, en lo que se refiere a la turbidez existen tendencias pero no hay diferencias significativas entre algunos de los puntos, debido a que el método de medición con el turbidímetro es más sensible para valores bajos de turbidez. En este caso se midió la variable con el fin de ver si se lograba obtener alguna tendencia incluyendo todos los puntos del diseño, ya que es una medición sencilla de realizar y muy rápida.

Los resultados obtenidos para el jugo de mora de 23,6 % de SIS se muestran en el cuadro IX.

**Cuadro X.** Valores de viscosidad, turbidez, rendimiento a nivel de laboratorio y porcentaje de sólidos insolubles en suspensión de jugos de mora con un 23,64 % SIS con distintos tratamientos enzimáticos utilizando el preparado enzimático A, a Y °C.

Parámetros	Tratamientos			
	C <sub>0</sub> ppm t <sub>√2</sub> min	C <sub>√2</sub> ppm t <sub>0</sub> min	C <sub>-√2</sub> ppm t <sub>0</sub> min	C <sub>0</sub> ppm t <sub>-√2</sub> min
Viscosidad (cP)	132,7 ± 6,5 <sup>a</sup>	136,0 ± 4,5 <sup>a</sup>	173,7 ± 15,6 <sup>b</sup>	142,7 ± 6,9 <sup>a</sup>
Turbidez (NTU)	10615 ± 444	10292 ± 426	10510 ± 652	10378 ± 865
Rendimiento a nivel de laboratorio (%)	81,6 ± 3,3	85,8 ± 0,9	83,8 ± 2,7	81,2 ± 4,6
SIS (%)	15,9 ± 1,8	16,1 ± 1,2	17,6 ± 1,0	16,2 ± 0,9

Nota: En una misma fila valores con letras diferentes indican una diferencia significativa según la prueba de Tukey ( $p \leq 0,05$ ), los resultados se presentan con un intervalo de confianza de un 95% (n=3), las mediciones de viscosidad se realizaron a 20 °C.

La única variable en la que se observó diferencias significativas entre los puntos axiales fue la viscosidad. Sin embargo, esta diferencia se observa solamente en uno de los puntos; para las demás variables no se obtuvo ninguna diferencia significativa ( $p \geq 0,05$ ). En este caso se podría optar por ampliar el rango del modelo, pero esto no se realizó ya que dichas condiciones no serían factibles para la empresa procesadora de frutas y vegetales.

Se decidió tomar la variable más promisoría que fue la viscosidad para realizar el análisis; por aparte se decidió medir la turbidez por ser una medición sencilla y rápida.

## 5.2 Pruebas definitivas

### 5.2.1 Selección del preparado enzimático más adecuado

Una vez que se obtuvo el método para la elaboración del jugo pulposo se realizó una selección de preparados enzimáticos disponibles en el mercado con el fin de determinar si existen diferencias entre ellos.

De acuerdo con Cozzano (2007), las paredes celulares de la mora están compuestas principalmente por pectina, donde se tiene que la pectina soluble en agua corresponde a un 46,7 % del material insoluble en alcohol (MIA), la pectina insoluble 20,8 % del MIA, el resto de los componentes mayoritarios son la hemicelulosa con un 12,7% de la MIA, lignina con un 7,7 % del MIA y celulosa con 7,2 % del MIA. Según Puuponen-Pimiä *et al.* (2008), los preparados enzimáticos con mezcla de actividad pectinasa, celulasa y hemicelulasa, son muy utilizados para el tratamiento enzimático de las frutas tipo bayas, por ello, se seleccionaron preparados enzimáticos con actividad celulolítica y pectolítica (ver anexo AI), que estuviesen disponibles en el mercado nacional y que no fuesen producidos a partir de organismos genéticamente modificados.

A continuación, en el cuadro X se muestran los parámetros evaluados para comparar y determinar cuál preparado enzimático era el más conveniente para realizar maceración del jugo de mora.

**Cuadro XI.** Parámetros evaluados para la determinación del preparado enzimático más promisorio para llevar a cabo el tratamiento enzimático de jugo pulposo de mora a una concentración de preparado enzimático de X ppm y a una temperatura de Y °C.

Parámetro	Tratamiento			
	Sin Preparado	(B)	(C)	(A)
% Rendimiento a nivel de laboratorio	83,8 ± 0,9	83,3 ± 3,9	83,7 ± 8,4	81,8 ± 2,1
% Sólidos Insolubles en Suspensión	15,9 ± 0,5 <sup>b</sup>	14,7 ± 0,1 <sup>a</sup>	14,7±0,4 <sup>a</sup>	14,9 ± 0,3 <sup>a</sup>
Turbidez (NTU)	1047 ± 28	999 ± 64	1019 ± 38	1024 ± 71

Nota: En la misma fila valores con letras diferentes indican una diferencia significativa según la prueba de Tukey ( $p \leq 0,05$ ), los resultados se presentan con un intervalo de confianza de un 95% ( $n=3$ ).

Como se puede ver en el cuadro anterior no hay diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en cuanto al rendimiento a nivel de laboratorio; esto se pudo deber a que el efecto de los preparados fue muy pequeño y no se notó la diferencia respecto al jugo sin tratamiento

enzimático. Estos resultados son similares a los obtenidos por Borowska *et al.* (2009) con jugo de aronia (*Aronia melanocarpa* E.), en donde no se obtuvo diferencia sobre el control en los tratamientos que no llevaban una maceración previa con calor. Buchert *et al.* (2005), analizaron también el efecto de varios preparados enzimáticos sobre el rendimiento de extracción de jugo de arándano (*Vaccinium myrtillus*); en este caso, obtuvieron porcentajes de extracción muy similares para varios de los preparados utilizados, por lo que se puede ver que, en general, si las características de los preparados enzimáticos son similares, se obtienen porcentajes de extracción parecidos.

En cuanto al porcentaje de SIS, se encontraron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre el hecho de usar o no emplear un preparado enzimático, sin embargo, no fue posible determinar una diferencia entre los resultados obtenidos para los diferentes preparados. Lo anterior se pudo dar porque los preparados enzimáticos tuvieron una actividad similar sobre el jugo, ya que estos tenían una actividad conjunta de pectinasas y celulasas las cuales presentan un efecto sinérgico (Vaillant *et al.*, 1999), por lo que se obtuvieron resultados similares. Estos resultados concuerdan también con los obtenidos por Soto (2010), quien no encontró diferencias en el porcentaje de extracción de varias muestras de mora prensada, tratadas con distintos preparados enzimáticos a 500 ppm.

No se pudo observar una diferencia significativa ( $p \leq 0,05$ ) en cuanto a la turbidez de los jugos obtenidos, ni se vio una tendencia; esto es inesperado ya que de acuerdo con Vaillant *et al.* (2008), la turbidez presenta cambios más notorios al modificarse el porcentaje de SIS en un jugo tratado enzimáticamente, con respecto a uno sin tratar, lo cual se puede deber a la variabilidad y sensibilidad propia de la medición de turbidez, como se mencionó anteriormente la medición de turbidez pierde precisión cuando se miden líquidos cuyo valor de turbidez es alto, ( $\pm 10\%$ ) esto por la por el diseño propio del equipo, aparte del hecho de que este error aumenta debido a que se tuvo que diluir la muestra para realizar la medición. En la literatura se mencionan comportamientos variados para la turbidez durante un tratamiento enzimático, por un lado se dice que la pectina es el principal compuesto causante de la turbidez y que esta disminuirá durante el tratamiento enzimático donde las enzimas degradarán la pectina (Grassin & Fauguenbergue, 1999; Sin *et al.*, 2006). Vaillant *et al.* (2008) mencionan que a un mismo valor de sólidos insolubles en suspensión, un jugo que ha sido tratado enzimáticamente tendrá una mayor concentración de polisacáridos que un jugo que no ha sido tratado enzimáticamente, por lo que su turbidez será mayor. Finalmente, Landbo *et al.* (2007)

mencionan que no se puede dar una tendencia firme del efecto del preparado enzimático sobre la turbidez ya que se debe conocer el mecanismo de formación y la composición de la turbidez en un jugo.

Al final de las pruebas realizadas no se encontró un preparado enzimático cuya acción fuese significativamente superior a los demás, solo se logró ver un efecto en cuanto a la reducción del porcentaje de SIS, probablemente debido a que la acción de los preparados fue similar sobre la materia prima. En este caso por consideraciones económicas (ver anexo AI), se eligió al preparado enzimático (A). Como recomendación se podría analizar el efecto de los preparados con otras metodologías más complejas como la utilizada por Cozzano (2007), quien midió la liberación de ácido galacturónico y azúcares neutros, producto de la hidrólisis de la pared celular, como variable respuesta para la selección de un preparado enzimático.

### **5.2.2 Optimización del tratamiento enzimático (tiempo y concentración del preparado enzimático) para dos tipos de jugo de mora**

En general la degradación de las sustancias pécticas depende de varios factores como el tiempo de incubación y la concentración de enzima; para optimizar estos parámetros se utiliza la metodología de superficie de respuesta (MSR), la cual permite determinar el efecto que tiene cada factor sino que también muestra la interacción entre los mismos, y ha sido utilizada en diversos estudios que involucran tratamientos enzimáticos para procesos de clarificación (Rastogi & Rashmi, 1999; Liyana-Pathirana & Shahidi, 2005; Sharma *et al.*, 2005; Sin *et al.*, 2006; Télésphore & He, 2009).

Una vez seleccionado el preparado enzimático se llevó a cabo el proceso de optimización de las condiciones para aplicar el tratamiento enzimático, mediante la metodología de superficie de respuesta utilizando un diseño central compuesto rotativo como se describió en el apartado 4.5.2 de la metodología. Se utilizaron como parámetros de proceso el tiempo de maceración y la concentración del preparado enzimático, ya que son los factores más importantes que afectan el proceso de maceración enzimática (Rai *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2006; Sin *et al.*, 2006; Liew Abdullah *et al.*, 2007; Télésphore & He, 2009). Las variables respuesta utilizadas fueron la viscosidad y la turbidez, ya que son propiedades determinantes para establecer la facilidad con la que se lleva a cabo un proceso de microfiltración tangencial (Cheryan & Alvarez, 1995; Lee *et al.*, 2006; Sin *et al.*,

2006; Vaillant *et al.*, 2008), además fueron las variables que obtuvieron los mejores resultados en la prueba preliminar descrita en el apartado 4.4.3.

Este procedimiento se realizó para el jugo obtenido mediante el uso combinado del despulpador y la hidroprensa con un porcentaje de sólidos insolubles en suspensión de 23,6 %, y para el jugo obtenido solamente con la hidroprensa. En los Anexos AXXI y AXXII, se muestran los valores obtenidos para cada uno de los tratamientos y a continuación en el cuadro XI se presenta el rango de respuesta para los diferentes parámetros evaluados para el jugo pulposo de mora con un 23,64 % de SIS y para el jugo prensado con la hidroprensa.

**Cuadro XII.** Efecto del tiempo de incubación y la concentración de enzima sobre la viscosidad y la turbidez de un jugo pulposo de mora con un 23,64 % de SIS y un jugo de mora prensado con hidroprensa, a un temperatura de Y °C.

<b>Tipo de jugo</b>	<b>Parámetro</b>	<b>Rango de variación</b>
<b>Jugo 23,64 % SIS</b>	Viscosidad (cP)	111-139
	Turbidez (NTU)	9513-11610
<b>Jugo prensado</b>	Viscosidad (cP)	1,15-1,41
	Turbidez (NTU)	336-448

A continuación en el cuadro XII se presentan los coeficientes de determinación,  $R^2$  y valores de probabilidad de los modelos generados para las dos variables dependientes analizadas en el jugo pulposo de mora con un 23,6 % de SIS.

**Cuadro XIII.** Coeficientes de determinación ( $R^2$ ) y valores de probabilidad de los modelos generados para las dos variables dependientes durante el tratamiento enzimático de jugo pulposo de mora con un 23,6 % de sólidos insolubles en suspensión.

Coeficiente de regresión	Viscosidad (cP)	Turbidez (NTU)
$b_0$	129,1111***	10712,22**
$b_1$	-4,1189	381,11
$b_2$	-0,6371	661,35
$b_{12}$	0,1667	325,00
$b_1^2$	-0,7222	-207,99
$b_2^2$	-5,2222	-18,82
$R^2$	0,4	0,78
<b>p o probabilidad</b>	0,66	0,097

Subíndices: 1= Concentración de enzima, 2=Tiempo de tratamiento.

\*\* Significativo a un nivel de 0,01

\*\*\* Significativo a un nivel de 0,001

Para el jugo pulposo se observó una variación en la viscosidad de la muestra de 28 cP; sin embargo, esta variación no es explicada satisfactoriamente por el modelo planteado ya que no existe ningún efecto significativo de las variables independientes evaluadas sobre la viscosidad en los rangos de tiempo y concentración de enzima seleccionados. Esto se puede ver en el bajo valor del coeficiente de determinación ( $R^2$ ), que indica el porcentaje de la variación que es explicada por parte del modelo y el impacto que tienen las variables dependientes sobre las variables respuesta (Lee *et al.*, 2006; Sin *et al.*, 2006). Además, la probabilidad del modelo no fue significativa ( $p > 0,05$ ) (Kopper, 2012), esto a pesar de que se tiene una gráfica de residuos aleatoria (ver Figura AI).

Para la turbidez se tuvo una variación de 2097 NTU y aunque el modelo posea un  $R^2$  aceptable (Liew Abdullah *et al.*, 2007), una probabilidad no significativa y una distribución de residuos aleatoria (ver Figura AII), tampoco fue posible explicar las variaciones de turbidez obtenidas en función del tiempo y la concentración de enzima en los rangos utilizados, ya que no hay ningún efecto significativo de las variables independientes sobre la turbidez, solamente un valor constante. Esto puede ser debido a que el equipo de

medición de la turbidez tiene una precisión de  $\pm 10\%$  cuando mide valores en el orden de las 10000 NTU (Hach Company, 2013).

En conclusión, para las variables respuesta analizadas en el jugo pulposo de 23,6 % de SIS no fue posible encontrar un punto óptimo de tiempo y concentración de enzima para realizar el tratamiento enzimático en los rangos analizados. En otros estudios de optimización de tratamientos enzimáticos para jugos de frutas se utilizaron rangos de concentración de enzima y tiempo mucho más amplios que los evaluados en este estudio y con variaciones en la temperatura (Rastogi & Rashmi, 1999; Lee *et al.*, 2006; Sin *et al.*, 2006; Liew Abdullah *et al.*, 2007; Kaur *et al.*, 2009), factor que no se consideró en este estudio. El rango estudiado para evaluar el efecto del tiempo y la concentración de enzima sobre las variables respuesta viscosidad y turbidez fue pequeño, de ahí que es posible que las diferencias se hubiesen podido encontrar si los rangos utilizados en estos factores hubiesen sido más amplios. Sin embargo, el enfoque de este estudio está en optimizar condiciones de trabajo más aptas para su aplicación industrial por lo que se buscó minimizar la cantidad de preparado enzimático utilizada y no pasar de un tiempo de incubación de 1 h. Como ya se mencionó se podrían utilizar otras variables respuesta como la liberación de ácido galacturónico y azúcares neutros como producto de la hidrólisis de la pared celular (Cozzano, 2007). También podrían realizarse pruebas que se reportan en la literatura para la optimización de tratamientos enzimáticos en jugos como filtrabilidad, en la cual un jugo centrifugado se hace pasar por un papel de filtro Whatman no.1 utilizando vacío; el resultado se expresa como el inverso del tiempo requerido para filtrar 300 mL de jugo (Lee *et al.*, 2006). Por último, se podría determinar la claridad, que es el porcentaje de transmitancia (%T) a 660 nm utilizando espectrofotómetro UV (Rastogi & Rashmi, 1999; Rai *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2006; Sin *et al.*, 2006; Liew Abdullah *et al.*, 2007).

En el cuadro XIII se presentan los coeficientes de determinación ( $R^2$ ) y valores de probabilidad de los modelos generados para las dos variables dependientes analizadas en el jugo de mora prensado.



**Cuadro XIV.** Coeficientes de determinación,  $R^2$  y valores de probabilidad para las dos variables dependientes para el tratamiento enzimático de jugo de mora prensado con menos del 1 % de sólidos insolubles en suspensión.

Coeficiente de regresión	Viscosidad (cP)	Turbidez (NTU)
$b_0$	1,251892***	371,1111*
$b_1$	-0,029612**	-2,6025
$b_2$	-0,000999	33,4040
$b_{12}$	-0,028585**	16,8333
$b_1^2$	0,039023**	2,8611
$b_2^2$	-0,035706**	20,1944
$R^2$	0,81	0,68
<b>p o probabilidad</b>	0,02*	0,22

Subíndices: 1= Concentración de enzima, 2=Tiempo de tratamiento.

\*Significativo a un nivel de 0,05

\*\* Significativo a un nivel de 0,01

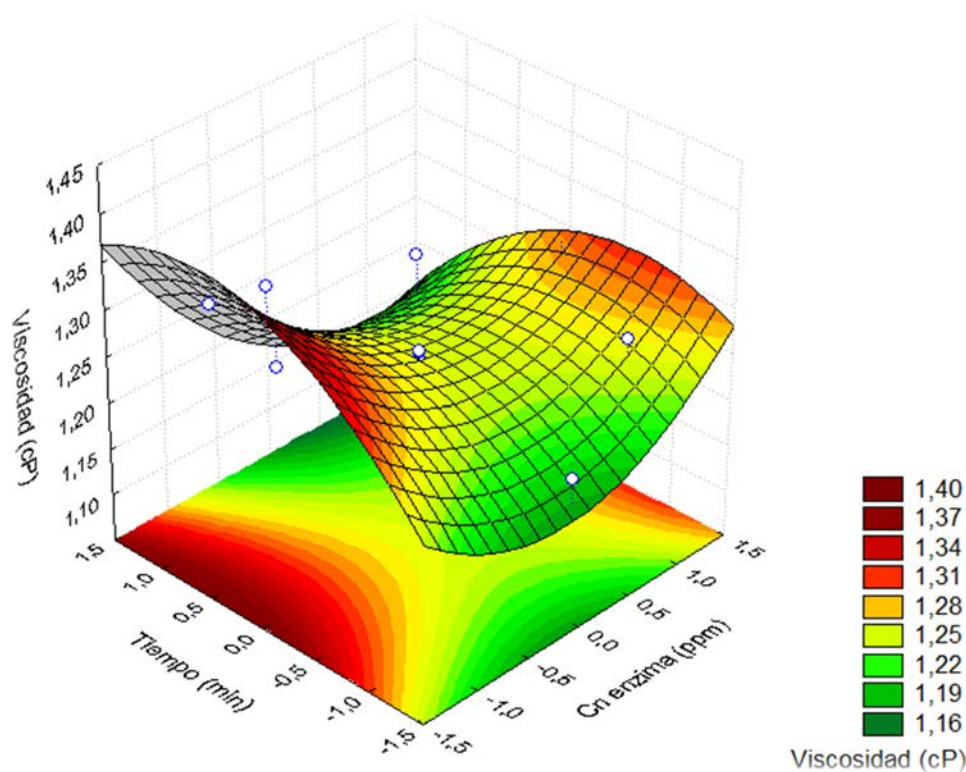
\*\*\* Significativo a un nivel de 0,001

En cuanto al jugo prensado para la variable respuesta turbidez se presentó una variación de 112 NTU, sin embargo, una vez más se obtiene un modelo que no explica las variaciones observadas, ya que a pesar de que se obtiene una distribución aleatoria (ver Figura AIII) no se obtiene ningún efecto significativo de las variables independientes sobre la variable respuesta. Además, el valor de  $R^2$  no es satisfactorio comparándolo con los valores que se obtienen en la literatura (Rai *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2006; Sin *et al.*, 2006; Liew Abdullah *et al.*, 2007), y la probabilidad del modelo no fue significativa. Al igual que en el caso del jugo pulposo con 23,6 % SIS, las razones para este comportamiento pueden ser los rangos de los factores evaluados; en este caso la precisión del equipo no juega un papel tan importante ya que en general los valores medidos para este jugo son más bajos que los del jugo pulposo (ver Anexos AXXI y AXXII).

Finalmente, para la variable respuesta viscosidad se obtuvo una variación de 0,26 cP entre los puntos experimentales, que a pesar de ser muy pequeña sí es explicada de manera satisfactoria por el modelo generado. En este caso se obtiene un valor de  $R^2$  de

0,81, lo que quiere decir que el modelo explica el 81 % de la variación de los datos experimentales obtenidos (Rai *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2006; Sin *et al.*, 2006; Liew Abdullah *et al.*, 2007); por otra parte, la probabilidad del modelo fue significativa, además la distribución de residuos fue aleatoria (ver Figura AIV). En este caso se encontró que la concentración de enzima tuvo un efecto significativo de manera lineal y al aumentar esta disminuye la viscosidad; también se encontró que la interacción entre la concentración de enzima y el tiempo de incubación tuvo un efecto significativo y negativo sobre la viscosidad. Por último, los términos cuadráticos tanto de la concentración de enzima como del tiempo de incubación ejercieron un efecto significativo sobre la viscosidad, pero en este caso el efecto cuadrático de la concentración de enzima tiene más bien un efecto positivo sobre esta variable respuesta, mientras que el efecto cuadrático del tiempo de incubación exhibió un efecto negativo.

En la figura 16 se muestra la superficie de respuesta obtenida.



**Figura 16.** Evolución de la viscosidad del jugo prensado de mora en función de la concentración de enzima y el tiempo de incubación a Y °C.

Como se puede ver en la figura 16, los valores más bajos de viscosidad (zonas verdes) se encuentran en las regiones en donde la concentración de enzima es de intermedia a alta y cuando los tiempos de incubación son bajos o muy altos. Este comportamiento de la viscosidad tiene que ver con el efecto cuadrático de la concentración del preparado enzimático (ver cuadro XIII), el cual tiene un efecto positivo sobre la viscosidad, es decir, tiene un punto mínimo en la superficie, y una región donde al incrementarse la cantidad del preparado enzimático ocurre un aumento en la viscosidad y este efecto tiene una alta significancia en el sistema ( $p \leq 0,01$ ). En un estudio realizado por Liew Abdullah *et al.* (2007) en jugo de carambola, estos autores encontraron que la viscosidad se ve afectada solamente por la interacción entre el tiempo y la concentración de enzima, y esta interacción es positiva, aumentando la viscosidad; en este trabajo se obtuvo una superficie de respuesta en la cual la viscosidad más alta se obtiene a tiempos intermedios, mientras que en los extremos bajos y altos, la viscosidad era más baja. Por otro lado, Sin *et al.* (2006) encontraron, en jugo de sapodilla (*Archas sapota*), que la viscosidad del jugo solo es afectada significativamente por la concentración de enzima y el tiempo de incubación, ambos de manera lineal, lo que generó un modelo en el cual las viscosidades más altas también se obtienen en tiempo intermedios, mientras que los valores más bajos de viscosidad se obtienen en los valores de tiempo bajos y altos. En este caso se menciona que la disminución de la viscosidad se debe a la degradación de la pectina en el jugo por parte del preparado enzimático. Esta pectina tiene una alta capacidad de ligar agua y al degradarse la estructura libera moléculas agua al medio, por ello se da una disminución en la viscosidad del jugo (Lee *et al.*, 2006; Sin *et al.*, 2006; Liew Abdullah *et al.*, 2007), lo cual es beneficioso para un posterior proceso de microfiltración (Cheyran & Alvarez, 1995).

Ahora es posible seleccionar un punto óptimo para llevar a cabo el tratamiento enzimático del jugo prensado de mora; además dicho valor se debe corroborar en un experimento subsecuente. A continuación en el cuadro XIV se presenta el punto seleccionado y los valores obtenidos en la corroboración experimental.

Dados los resultados obtenidos, se tomó en cuenta únicamente la variable viscosidad para la selección del punto óptimo combinando los factores tiempo-concentración de preparado enzimático para el jugo prensado de mora. Se buscó un punto en donde se obtuviese la menor viscosidad posible dentro de los parámetros estudiados; también, se consideró el costo del proceso por lo que se tomó en cuenta el uso de la menor cantidad

de preparado enzimático (Liew Abdullah *et al.*, 2007) y el menor tiempo de maceración posible. Se seleccionó como punto óptimo para el tratamiento enzimático del jugo prensado de mora, la combinación de  $C_0$  ppm de preparado enzimático durante  $t_{-\sqrt{2}}$  min a  $Y$  °C, correspondiente a uno de los puntos axiales del diseño experimental utilizado.

**Cuadro XV.** Valor experimental de respuesta en las condiciones óptimas.

Condición óptima	Valor codificado	Valor real	
Concentración de enzima	0	$C_0$	
Tiempo de tratamiento	$-\sqrt{2}$	$t_{-\sqrt{2}}$	
		Valores experimentales	
Respuestas	Valor esperado	Promedio*	Rango
Viscosidad (cP)	1,21	$1,23 \pm 0,01$	1,22 - 1,24

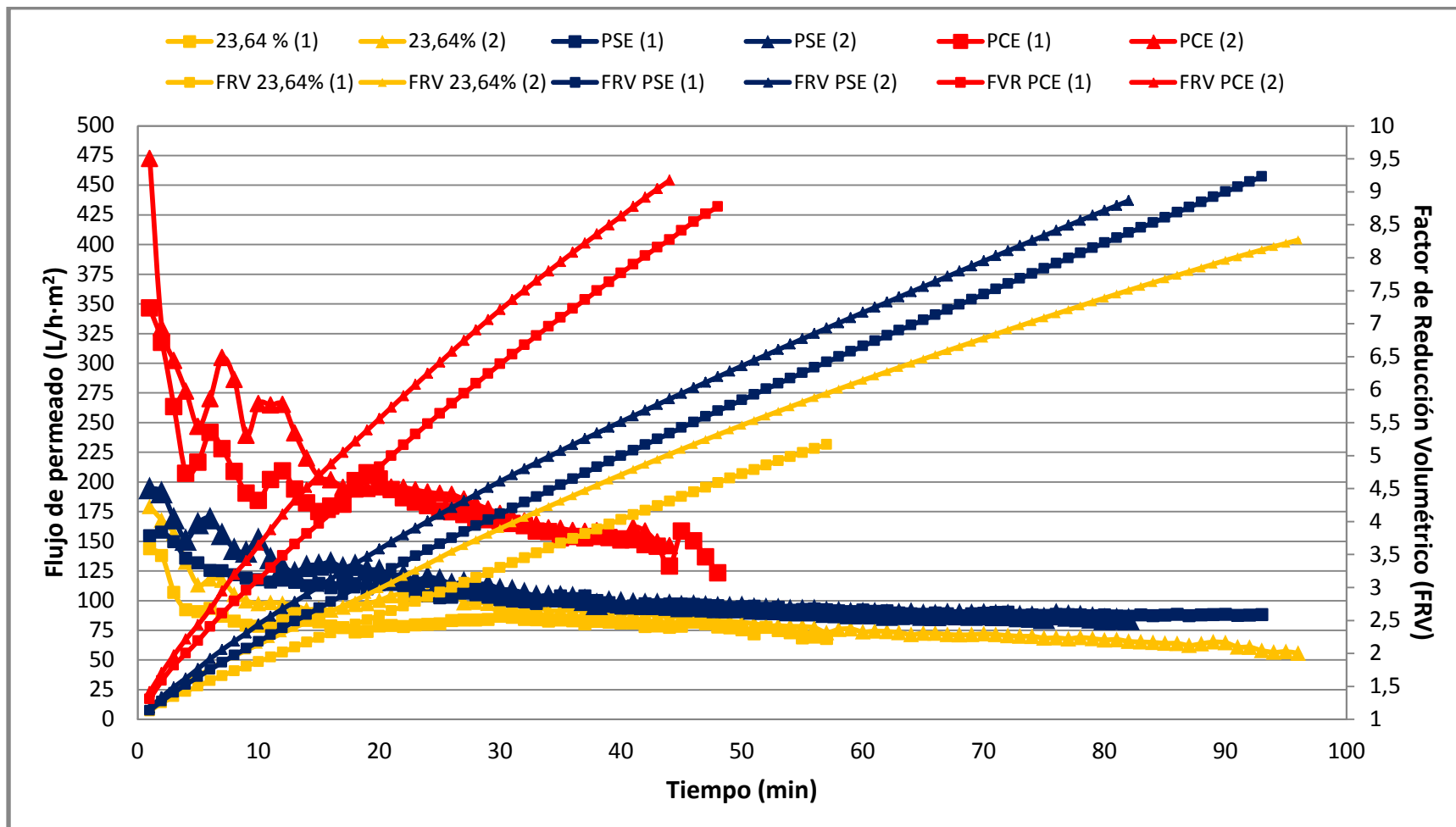
\*n=2

Se verificó que el modelo generado fuera adecuado, observando si se obtienen los valores esperados de viscosidad utilizando las condiciones determinadas como óptimas, en una prueba con una muestra de jugo (Sun *et al.*, 2006). Estos resultados se pueden observar en el cuadro XIV, donde el valor obtenido es muy cercano al esperado y no se encontró diferencia estadística utilizando la prueba t de *Student* (ver anexo AXXIII) por lo que se considera que el modelo generado es adecuado para predecir la viscosidad del jugo de mora obtenido por presando (Liyana-Patharina & Shahidi, 2005).

Por otro lado, para el jugo pulposo, no se logró generar un modelo satisfactorio que permitiera escoger las mejores condiciones de tratamiento enzimático, durante las pruebas del primer objetivo se encontró que exista un efecto positivo con respecto al uso de un tratamiento enzimático; además, esta opción no requiere cambiar el equipo para la extracción de jugo. Se realizaron por lo tanto ensayos de microfiltración utilizando esta materia prima, aplicando un tratamiento enzimático con las condiciones del punto central del diseño experimental propuesto para asegurarse de obtener la diferencia observada en el objetivo 1, por lo que se realizó el tratamiento a  $C_0$  ppm de preparado enzimático durante  $t_0$  min a una temperatura de  $Y$ °C.

### **5.2.3 Determinación del proceso de obtención de jugo de mora más adecuado para alcanzar los flujos y rendimientos más altos en la microfiltración tangencial (MFT) a nivel piloto**

En la figura 17, se puede observar el cambio de los flujos de permeado y de FRV en función del tiempo de microfiltración tangencial a escala de planta piloto, para cada uno de los tratamientos estudiados. En todos los casos se observa que los flujos presentan un comportamiento esperado en donde se da una caída rápida del flujo de permeado en los primeros minutos, seguido de un período en donde se da un declive más leve y prolongado del flujo hasta que se llega a un período de estabilidad (Cassano *et al.*, 2007). Finalmente Vaillant *et al.* (2001), mencionan una etapa final en donde el flujo vuelve a caer hasta valores menores a  $20 \text{ L/h}\cdot\text{m}^2$ , etapa que no se observó en los ensayos realizados. En general, lo que se busca para una posible aplicación industrial es encontrar el punto antes de que ocurra esta disminución con el fin de obtener el mayor rendimiento posible (medido a través del FRV), con un flujo de permeado que sea económicamente factible. Es importante mencionar que no se logró mantener la presión transmembranaria objetivo de  $Z \text{ bar}$ , y que se trabajó en promedio a  $W \text{ bar}$  donde ( $W > Z$ ), esto por las características propias del equipo piloto utilizado, lo cual puede influir en que se obtengan flujos un poco más altos que los obtenidos por Montero (2008).



**Figura 17.** Evolución del flujo de permeado y del valor FRV para jugo de mora con tres tipos diferentes de procesos de obtención, jugo pulposo con un 23,64% tratado enzimáticamente (23,64%), jugo prensado sin tratamiento enzimático (PSE) y jugo prensado con tratamiento enzimático (PCE) a una temperatura de Y °C y a una presión transmembranaria promedio de W bar. Los números entre paréntesis indican el número de repetición)

En la figura 17, se puede observar que no se llegó al punto en donde el flujo de permeado decae a valores menores de 20 L/h·m<sup>2</sup>, y que aún a valores de FRV de 8 no se alcanzó dicha etapa. Por otro lado, se puede ver la diferencia que existe entre los diferentes tratamientos aplicados; el primer tratamiento (línea amarilla) corresponde al método de extracción de jugo definido en las pruebas preliminares; este se toma como el tratamiento base ya que no implica hacer ningún cambio en la metodología que utiliza la empresa, salvo la aplicación del tratamiento enzimático a una concentración de C<sub>0</sub> ppm por t<sub>0</sub> min. Si se calcula el promedio del flujo de permeado de cada uno de los tratamientos entre los 15 a los 45 min, se puede ver que los flujos obtenidos con el tratamiento definido en las pruebas preliminares son significativamente más bajos (p≤0,05) como se muestra en el Cuadro XV.

**Cuadro XVI.** Flujos promedio de permeado para un tiempo comprendido entre 15 min a 45 min de microfiltración tangencial a una temperatura de Y °C y a una presión transmembranaria promedio de W bar.

<b>Tipo de jugo de alimentación</b>	<b>Jugo 23,6 % de SIS</b>	<b>Jugo prensado sin tratamiento enzimático (&lt;1% SIS)</b>	<b>Jugo prensado con tratamiento enzimático (&lt;1% SIS)</b>
Flujo de permeado (L/hm <sup>2</sup> )	88,28 <sup>c</sup>	107,46 <sup>b</sup>	171,98 <sup>a</sup>

Nota: En la misma fila valores con letras diferentes indican una diferencia significativa según la prueba de Tukey (p≤0,05), n=2.

Además, se aprecia que los flujos en los tratamientos en los que se aplicó un prensado, son distintos entre sí, ya que al que se le aplicó maceración enzimática presentó mayores flujos.

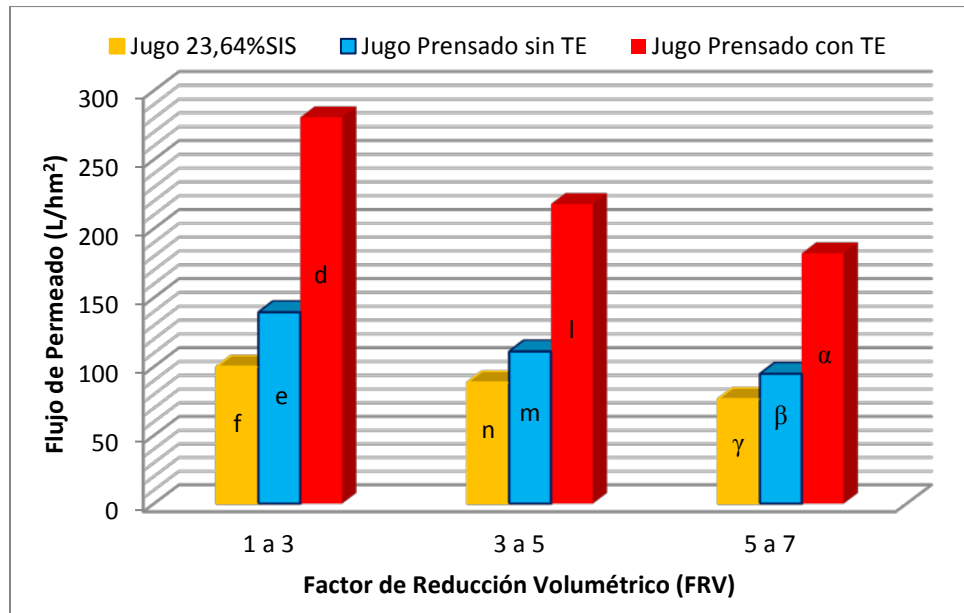
Estas diferencias se deben a varios factores; primero están los sólidos insolubles en suspensión, los cuales como se mencionó anteriormente incluyen a la pectina insoluble, celulosa, hemicelulosa, gránulos de almidón, restos de paredes celulares y microorganismos (Ushikubo *et al.*, 2007; Vaillant *et al.*, 2008), por lo que al procesar un jugo con un contenido de SIS de 23,6 %, se obtienen los menores flujos. Esto ya que tiene una cantidad mucho más alta de estas sustancias, con respecto a los jugos utilizados en los otros tratamientos que contienen menos del 1 % de SIS, lo cual muestra la ventaja de utilizar un equipo como la hidroprensa sobre el que se utilizaría en la empresa, que es una prensa de tornillo, sin embargo se debe considerar que esta última

es un equipo continuo por lo que su operación es más rápida pero da una menor productividad a la hora de microfiltrar.

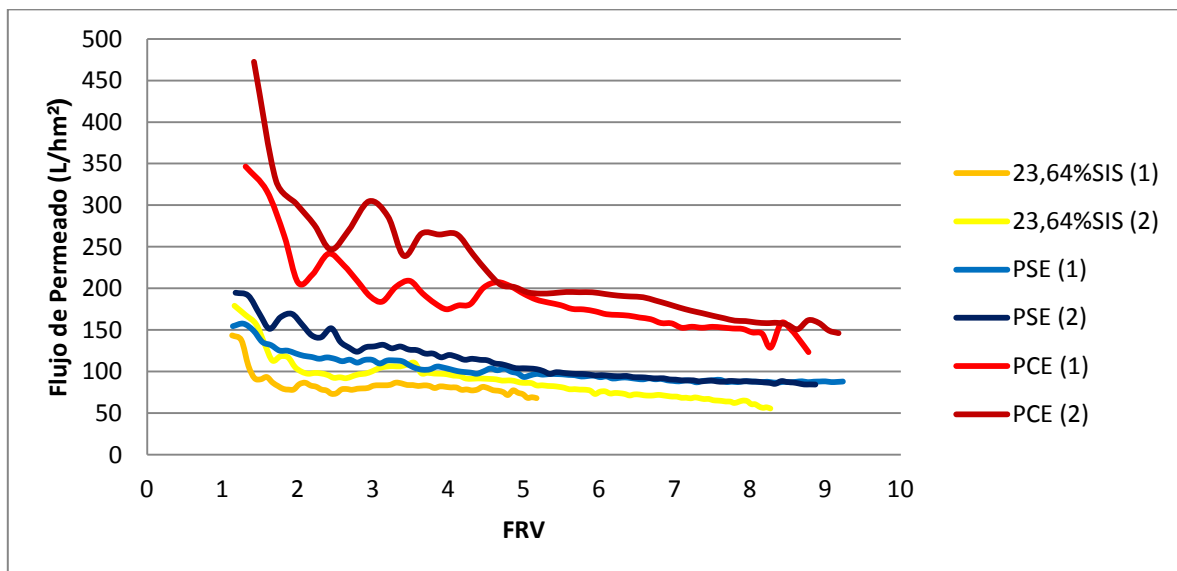
Por otro lado, se deseaba ver el efecto del tratamiento enzimático, sobre los flujos de permeado. Esto se puede notar en los resultados obtenidos para el jugo elaborado mediante el método de extracción con hidroprensa sin tratamiento enzimático (línea azul), con respecto al generado empleando el método con hidroprensa pero con un tratamiento enzimático previo a la microfiltración (línea roja). Se observa que a pesar de que se tenían materias primas similares en cuanto a la cantidad de sólidos insolubles en suspensión, el método que tiene un tratamiento enzimático presenta flujos de permeado más altos, esto debido a que este degrada componentes de la pared celular que en condiciones normales se depositan en la superficie de la membrana y causan el proceso de polarización por concentración. Esto genera un colmataje de la membrana aumentando la resistencia mecánica al paso del jugo (Vaillant *et al.*, 2001; Vladisavljević *et al.*, 2003; Cassano *et al.*, 2007; Pagliero *et al.*, 2011; DasGupta & Sarkar, 2012).

Si se comparan los flujos de permeado a diferentes valores de FRV (ver Figura 18), se observa que existen diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre cada uno de los flujos de permeado obtenidos con cada metodología de procesamiento, lo que confirma lo observado anteriormente. Se nota además el efecto del tratamiento enzimático y del uso de un método de extracción que permite obtener un jugo con una menor cantidad de sólidos insolubles en suspensión, lo cual muestra la utilidad de realizar la maceración con enzimas a pesar de los inconvenientes que este puede presentar para la empresa como es el tiempo de espera (que en este caso es corto) y el calentamiento del jugo el cual involucra un costo. También, es posible ver que la diferencia entre los flujos para los distintos tipos de jugo, a pesar de que siempre es significativa, va disminuyendo conforme aumenta el valor del FRV, lo que se puede apreciar mejor en la figura 19. Esto debido a que, aunque se realice un tratamiento enzimático, aun queda una importante proporción de polisacáridos de la pared celular que son resistentes al ataque enzimático, por lo que se van acumulando en el producto retenido, incrementando la resistencia de la capa colmatante sobre la membrana y por ende reduciendo el flujo de permeado (Vaillant *et al.*, 2001).





**Figura 18.** Flujos de permeado a diferentes valores promedio de FRV para jugos obtenidos mediante distintos procesos de extracción para cada rango de FRV (barras con letras diferentes indican una diferencia significativa según la prueba de Tukey;  $p \leq 0,05$  ( $n=2$ )).



**Figura 19.** Flujo de permeado en función del valor de FRV para tres metodologías de procesamiento de jugo de mora (23,6%SIS: jugo pulposo con un 23,64% de SIS y tratamiento enzimático, PSE: jugo prensado sin tratamiento enzimático y PCE: jugo prensado con tratamiento enzimático, los números entre paréntesis indican la repetición).

Adicionalmente, para evaluar cada una de las metodologías propuestas se realizó un análisis de costos con fines comparativos evaluando los siguientes parámetros: costo de la materia prima, el costo del preparado enzimático, la depreciación del equipo (considerando una depreciación a 3 años), el consumo energético y el costo de las horas hombre. Se calcularon los costos operativos para una jornada de 8 horas y a cuatro valores de FRV como se describe en el apartado 4.7.10 de la metodología; a continuación se muestran los resultados obtenidos en el cuadro XVI.

**Cuadro XVII.** Flujo de permeado, producción diaria, costo y aporte de la materia prima, para los procesos estudiados de obtención de jugo microfiltrado de mora a varios valores de FRV.

Tratamientos	Parámetros de productividad	FRV			
		6	7	8	9
23,6% SIS	Flujo (L/hm <sup>2</sup> )	71,91	69,95	60,95	NM
	Producción diaria (L/m <sup>2</sup> )	143,82	139,90	121,90	NM
	Costo total (Colones*m <sup>2</sup> /L)	1826,81	1780,76	1758,95	NM
	Costo de la materia prima (Colones*m <sup>2</sup> /L)	1739,13	1690,82	1656,31	NM
PSE	Flujo (L/hm <sup>2</sup> )	93,32	88,86	88,09	88,27
	Producción diaria (L/m <sup>2</sup> )	466,60	444,30	440,45	441,35
	Costo total (Colones*m <sup>2</sup> /L)	1957,75	1905,11	1866,91	1838,06
	Costo de la materia prima (Colones*m <sup>2</sup> /L)	1935,48	1881,72	1843,32	1814,52
PCE	Flujo (L/hm <sup>2</sup> )	172,45	158,00	147,09	149,36
	Producción diaria (L/m <sup>2</sup> )	862,25	790,00	735,45	746,80
	Costo total (Colones*m <sup>2</sup> /L)	1861,78	1811,50	1775,77	1748,03
	Costo de la materia prima (Colones*m <sup>2</sup> /L)	1846,15	1794,87	1758,24	1730,77

NM: No se midió; PSE: proceso sin tratamiento enzimático; PCE: proceso con tratamiento enzimático

Como se puede observar en el cuadro XVI, el flujo decrece conforme se incrementa el valor de FRV. Este comportamiento es normal, ya que el colmataje de la membrana va en aumento a medida que pasa una mayor cantidad de materia prima a través de ella. Por otra parte, se aprecia que los costos en cada uno de los tratamientos son muy similares entre sí. Sin embargo, es destacable el aporte de la materia prima en cada uno de los costos para cualquier tratamiento y rendimiento, siendo más de un 90 % en todos los casos, por lo que es evidente de que el costo de este proceso dependerá principalmente del valor que tenga la materia prima en el mercado.

En ese sentido para seleccionar el tratamiento más adecuado es vital escoger aquel con el que se puede obtener el mayor rendimiento posible, ya que de esta forma se aprovecha mejor la materia prima. Esto es muy difícil en el tratamiento de un jugo con un % SIS de 23,6, ya que su procesamiento se complica a medida que el rendimiento aumenta, además se requieren dos ciclos de lavado de la membrana para obtener al menos un 80 % de la permeabilidad antes de su uso. Esto obliga a descartar el tratamiento con un jugo pulposo, mientras que el procedimiento con jugo prensado tratado enzimáticamente (PCE) sería mejor que el proceso sin maceración (PSE). Esto ya que se pueden lograr mejores flujos con rendimientos más altos, sin tener que hacer más de un ciclo de lavado de la membrana, por lo que esta sería la metodología a utilizar, tomando en cuenta que el costo del tratamiento enzimático es muy pequeño con respecto al costo total del proceso y que este tratamiento es de muy corta duración (10 min).

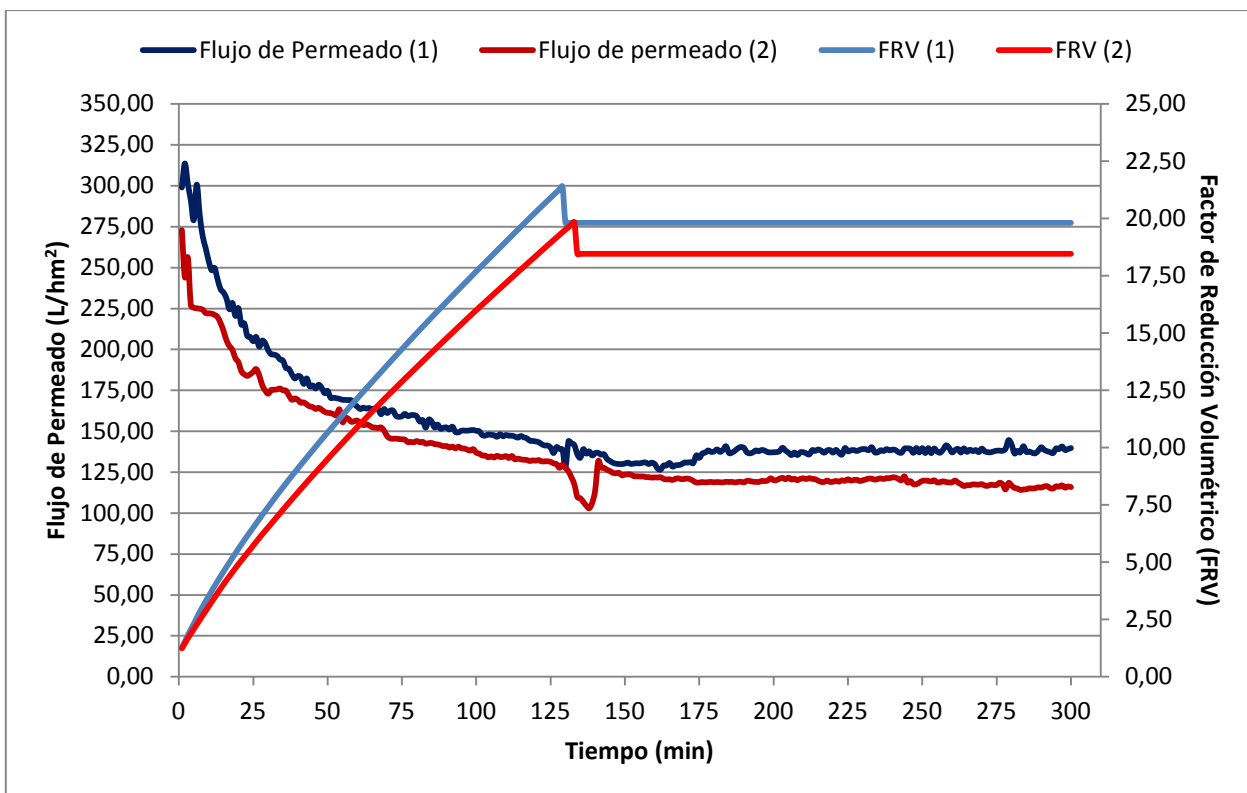
En comparación con los otros dos tratamientos, el PCE, al tener mayores flujos de permeado, es un proceso que tiene una productividad 6 veces mayor a la que utiliza un jugo con un 23,6 % SIS y 1,8 veces mayor al del tratamiento PSE, con un costo por litro muy similar, por lo que una mayor productividad es la ventaja que ofrece este tratamiento.

Otra posibilidad es aumentar la productividad de los tratamientos, aumentando la superficie disponible de membrana; esto permitiría aumentar los flujos de permeado que se obtienen.

A continuación se realizaron ensayos de larga duración en modo alimentación-extracción utilizando la metodología de prensado con tratamiento enzimático.

#### **5.2.4 Evaluación de la factibilidad técnica del proceso mediante ensayos de MFT de larga duración a escala piloto.**

Se realizaron dos ensayos de larga duración con el fin de observar el comportamiento que podría tener industrialmente el método de procesamiento propuesto para la microfiltración de jugo de mora. El objetivo de ambas repeticiones fue alcanzar un valor de FRV de alrededor de 20, que correspondería a un 95 % de rendimiento y luego mantener el valor de FRV constante mediante la recirculación del permeado, trabajando a Y °C y a una presión transmembranaria de alrededor de Z bar; en la figura 20 se puede ver el comportamiento de los flujos obtenidos.



**Figura 20.** Evolución del flujo de permeado y del FRV durante la MFT de jugo prensado de mora con un tratamiento enzimático previo con el preparado enzimático A a una concentración de  $C_0$  ppm por  $t_{-1/2}$  min, a una temperatura de  $Y$  °C y una presión transmembranaria de  $W$  bar.

En ambos casos el proceso de recirculación del permeado inició alrededor de los 125 min de proceso y los flujos se estabilizaron cerca de los 125 L/h·m<sup>2</sup> y se mantuvieron así por casi 3 h más, con valores de FRV de 20 para la primera repetición y de 18,5 en la segunda. El objetivo de recircular el permeado fue simular la extracción de retenido para mantener el FRV constante, esto por limitaciones económicas en cuanto a la compra de materia prima. Las diferencias que se presentaron entre las repeticiones se deben a diferencias entre los lotes de materia prima (ver cuadro XVII), además hay que mencionar que una vez más la presión transmembranaria fue más alta de lo deseado, obteniéndose un valor promedio de  $W$  bar.

También, se puede notar que ocurre una caída en el valor de FRV cuando se inicia la recirculación del jugo; esta disminución se debe a que hay un aumento en el volumen de retenido al inicio del proceso de recirculación, porque se extrae una muestra de 500 mL de retenido al inicio de esta etapa. Otro comportamiento que se obtuvo fue una caída del

flujo de permeado en la segunda repetición, al inicio del proceso de circulación; debido al tiempo que le tomó al sistema alcanzar la presión transmembranaria que tenía antes de extraer la muestra de retenido en ese momento, ya que este parámetro se mantuvo en un valor más bajo por unos minutos y luego se estabilizó, lo que se tradujo en un aumento en el flujo de permeado.

Se puede notar que la segunda repetición tiene flujos más bajos que la primera, esto se puede explicar con los datos que se presentan a continuación, en el cuadro XVII.

**Cuadro XVIII.** Viscosidad, turbidez, sólidos solubles y pH del jugo inicial para las dos repeticiones de los ensayos de larga duración de MFT de jugo de mora.

Repetición	Viscosidad (cP)	Turbidez (NTU)	Sólidos Solubles	pH
1	12,7	332	11,00	2,76
2	11,3	889	9,83	2,88

En el cuadro XVII es posible observar que, la turbidez es mucho más alta en la materia prima utilizada para la segunda repetición, lo cual explicaría la razón por la cual se tiene un flujo de permeado (ver figura 20) un poco menor en la segunda repetición durante la MFT, ya que la turbidez indica una mayor cantidad de partículas suspendidas, por ende el proceso de colmatación de la membrana es mayor.

Se puede hacer una comparación del flujo obtenido, con los obtenidos en diferentes estudios con otras frutas, reportados por distintos autores; el cuadro XVIII resume los resultados.

**Cuadro XIX.** Flujos de permeado y valores de FRV reportados para la microfiltración de distintas frutas.

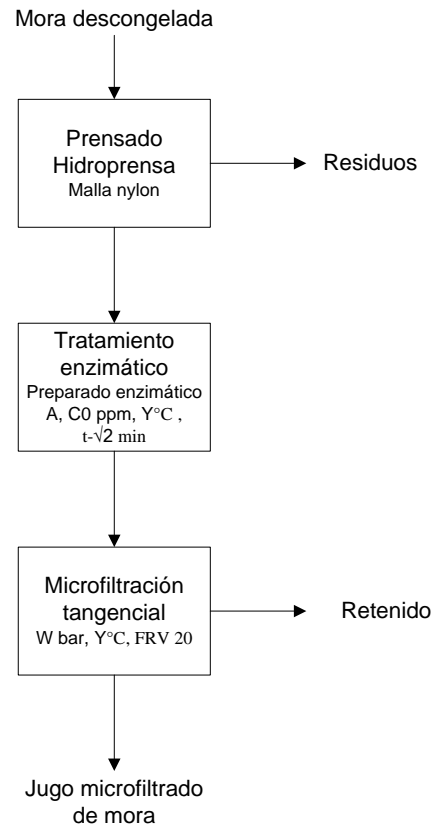
<b>Fruta</b>	<b>Flujo obtenido (L/hm<sup>2</sup>)</b>	<b>FRV Óptimo</b>	<b>Fuente</b>
<b>Rosa de Jamaica</b>	50	20	Cisse <i>et al.</i> (2011)
<b>Mandarina</b>	50	3,5	Vaillant <i>et al.</i> (2001)
<b>Mango</b>	60	1,3	Vaillant <i>et al.</i> (2001)
<b>Maracuyá</b>	40	3,0	Vaillant <i>et al.</i> (2001)
<b>Mora</b>	125	20	Presente trabajo
<b>Mora</b>	130	18,4	Montero (2008)
<b>Mora de Castilla</b>	70	3,0	Vaillant <i>et al.</i> (2001)
<b>Naranjilla</b>	65	3,2	Vaillant <i>et al.</i> (2001)
<b>Piña</b>	70	3,5	Vaillant <i>et al.</i> (2001)

Como se puede observar en el cuadro XVIII, Montero (2008) obtuvo con jugo prensado de mora obtenido mediante una prensa hidráulica, un flujo de permeado de alrededor de 130 L/h·m<sup>2</sup>, con un FRV de 18,4, resultado que es similar al obtenido en la presente investigación. Esta similitud se debe a que las partículas responsables del proceso de colmatación de la membrana no bloquean, en las condiciones estudiadas, el interior de los poros de esta, lo que permite mantener flujos muy altos y rendimientos de microfiltración mayores al 90 %. En el proceso de MFT la etapa más crítica en cuanto a rendimiento corresponde a la extracción del jugo. Dado que la materia prima representa el mayor costo durante el proceso, esta es la etapa clave para que sea económicamente factible, porque se logran rendimientos que van de un 60 a 65 % para obtener el jugo prensado, lo cual es menor al método convencional para la obtención de un puré de mora que es de un 74 % (Gancel *et al.*, 2011). Sin embargo, la microfiltración tangencial de un jugo prensado tiene como ventaja que se obtiene un producto que es claro, sin una turbidez observable y que, además, no ha recibido tratamientos con temperatura que puedan afectar los

compuestos antioxidantes, además solamente se tiene la retención de algunos de estos compuestos debido a que son separados en la membrana junto a los compuestos insolubles (Soto, 2010).

Otros estudios como el de Cisse *et al.* (2011), reportan flujos mucho más bajos de permeado con extractos como el de rosa de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) a valores de FRV de 20, esto a una presión transmembranaria similar a la utilizada en el presente estudio. Por otro lado, Vaillant *et al.* (2001) realizaron ensayos con varias frutas en donde se obtuvieron valores de FRV en los cuales el retenido tuviese una concentración de SIS, similar al de la materia prima antes del tratamiento enzimático, esto para aprovechar el retenido como un producto valorizable, por esta razón se obtienen flujos y valores de FRV's más bajos. Finalmente, se nota que la metodología que acopla la extracción mediante el prensado utilizando la hidroprensa, junto a un tratamiento enzimático ayuda a obtener flujos y rendimientos mucho más altos con respecto a los encontrados en la literatura, lo que es promisorio para un posterior estudio de factibilidad técnica y económica.

A manera de recomendación, bajo las condiciones de operación que se tienen en la empresa, sería importante hacer pruebas con un método de extracción de jugo por medio del cual se obtenga un producto con una cantidad baja de % SIS (menos del 1%), con el fin aumentar la productividad en la etapa de microfiltración tangencial, en la figura 21 se incluye un flujo de proceso del procedimiento recomendado para la obtención de jugo microfiltrado de mora.



**Figura 21.** Flujo de proceso definitivo para la obtención de jugo microfiltrado de mora.



## VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 6.1 Conclusiones

- No se encontraron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) en los valores de turbidez y el rendimiento de extracción, mientras que para el porcentaje de SIS solo se encontró diferencia significativa entre el control y los preparados enzimáticos, pero no así entre los preparados, por lo que se seleccionó el preparado enzimático de menor costo.
- Las condiciones del punto óptimo para el tratamiento enzimático del jugo prensado fueron  $t_{\sqrt{2}}$  min de tiempo de incubación y  $C_0$  ppm de concentración del preparado enzimático seleccionado, a una temperatura de  $Y$  °C, para obtener la viscosidad más baja.
- Hay un aumento significativo en el flujo permeado obtenido durante la microfiltración de jugo de mora, cuando se realiza la extracción del jugo combinando el uso de la hidroprensa y un tratamiento enzimático ( $175 \text{ L/h}\cdot\text{m}^2$ ), con respecto a los procesos donde se utiliza jugo extraído con la hidroprensa (sin tratamiento enzimático) ( $100 \text{ L/h}\cdot\text{m}^2$ ) y jugo pulposo tratado enzimáticamente similar al de la empresa procesadora de frutas y vegetales ( $75 \text{ L/h}\cdot\text{m}^2$ ).
- Es posible mantener un flujo de jugo clarificado de  $125 \text{ L/h}\cdot\text{m}^2$  durante 5 h con un valor de FRV de 20 a nivel de escala planta piloto, equivalente a un rendimiento del 95% en términos de producto permeado, utilizando como método de extracción el prensado con hidroprensa y aplicando un tratamiento enzimático con el preparado enzimático A a  $C_0$  ppm por  $t_{\sqrt{2}}$  min, lo que hace que el proceso sea muy promisorio para su posible implementación a nivel industrial.
- El costo más importante para la factibilidad económica del proceso es el de la materia prima, siendo más del 90% de los costos en todos los casos estudiados.

## 6.2 Recomendaciones

- Utilizar variables respuesta más sensibles, como la filtrabilidad o la claridad para que sea posible seleccionar un preparado enzimático con base en el rendimiento de extracción de jugo. Esto con el objetivo de comparar si dicho rendimiento compensa el costo del preparado, y para optimizar el tratamiento enzimático con el fin de obtener puntos óptimos para la realización de dichos tratamientos, en especial para el jugo pulposo.
- Realizar ensayos en modo concentración hasta observar la caída abrupta en el flujo de permeado y así obtener un valor de FRV máximo.
- Considerar la formulación previa de una bebida de mora, que sería un producto más diluido y su posterior microfiltración, lo cual podría tener un efecto beneficioso sobre los flujos de permeado.
- Realizar un plan de negocios completo sobre la operación de elaboración de jugo microfiltrado de mora, así como un estudio de mercado con el fin de obtener costos más exactos de la operación y un posible valor del producto como materia prima para la elaboración de bebidas, así como definir el diseño del producto terminado y el público meta al que iría dirigido.
- Considerar el acople de la microfiltración tangencial a una línea de envase aséptico para elaborar un producto de mayor duración almacenado y comercializado a temperatura ambiente, sin tratamiento térmico, que pueda abastecer el mercado de los “*raw foods*” (alimentos “vivos o crudos”).
- Investigar acerca del uso de los subproductos obtenidos durante la operación de extracción de jugo, para aumentar la rentabilidad económica del proceso.
- Realizar ensayos de larga duración, de al menos una jornada laboral de ocho horas, con materia prima en suficiente cantidad para determinar si es posible mantener los flujos de jugos clarificados observados en esta investigación.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- ACOSTA-MONTOYA, Ó., VAILLANT, F., COZZANO, S., MERTZ, C., PÉREZ, A.M. & CASTRO, M.V.** 2010. Phenolic content and antioxidant capacity of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichus* Schltdl.) during three edible maturity stages. *Food Chemistry*. 119(4):1497-1501.
- ANLASIK, T., SIES, H, GRIFFITHS, H. R., MECOCCI, P., STAHL, W.& POLIDORI, M. C.** 2005. Dietary habits are major determinants of the plasma antioxidant status in healthy elderly subjects. *British Journal of Nutrition*. 94: 639-642.
- ARIAS, C.** 2008. Perfil Producto Mora. San José. INTERNET. <http://servicios.procomer.go.cr/aplicacion/civ/documentos/Perfil%20de%20mora.pdf>. (18/05/14).
- BATES, R.P., MORRIS, J.R. & CRANDALL, P.G.** 2001. Principles and practices of small and medium scale fruit juice processing. FAO, Roma.
- BECH-LARSEN, T & SCHOLDERER, J.** 2007. Functional foods in Europe: consumer research, market experiences and regulatory aspects. *Trends in Food Science & Technology*. 18: 231-234.
- BOROWSKA, E. J., SZAJDEK, A. & CZAPLICKI, S.** 2009. Effect of heat and enzyme treatment on yield, phenolic content and antioxidant capacity of juices from chokeberry mash. *Italian Journal of Food Science*. 21(2): 197-209.
- BRENNAN, J.G., GRANDISON, A. S. & LEWIS, M.J.** 2006. Separations in food processing. *In* J.G. Brennan, ed. *Food Processing Handbook*. Wiley-VCH, Weinheim. Pp. 429-512.
- 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: 2548-2556.

- CARNEIRO, L., DOS SANTOS SA, I., DOS SANTOS GOMES, F., MARTINS MATTA, V. & CORRÊA CABRAL, L. M.** 2002. Cold sterilization and clarification of pineapple juice by tangential microfiltration. *Desalination*. 148: 93-98.
- CASSANO, A., MARCHIO, M. & DRIOLI, E.** 2007. Clarification of blood orange juice by ultrafiltration: analyses of operating parameters, membrane fouling and juice quality. *Desalination*. 212:15-27.
- CASTRO, J. & CERDAS, M.** 2005. Mora (*Rubus* spp.): Cultivo y Manejo poscosecha. MAG. Costa Rica.
- CHEYRAN, M.** 1998. Ultrafiltration and microfiltration handbook. Technomic Publishing Company, Basel.
- CHERYAN, M. & ALVAREZ, J. R.** 1995. Food and beverage industry applications. In R.D. Noble & S.A. Stern, eds. Membrane separation technology principles and applications. Elsevier, Amsterdam, p. 415-465.
- CISSE, M., VAILLANT, F., SORO, D., REYNES, M. & DORNIER, M.** 2011. Crossflow microfiltration for the cold stabilization of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract. *Journal of Food Engineering*. 106: 20-27.
- CODEX.** 2005. Codex stan 247:2005 Codex general standard for fruit juices and nectars. s.l.
- COZZANO, S.** 2007. Impacto del proceso de microfiltración tangencial sobre el valor de la mora (*Rubus* spp) como alimento funcional. Tesis de Maestría en Ciencia de Alimentos. Universidad de Costa Rica, Escuela de Tecnología de Alimentos. San José.
- DALAL, S., SHARMA, A. & NATH GUPTA, M.** 2007. A multipurpose immobilized biocatalyst with pectinase, xylanase and cellulase activities. *Chemistry Central Journal*. 1(16): 1-5.

- DASGUPTA, S. & SARKAR, B.** 2012. Membrane applications in fruit processing technologies. *In* S. Rodrigues & F.A. Fernandes, eds. Advances in fruit processing technologies. CRC Press, Florida. Pp. 87-148.
- DIPLOCK, A.T.** 1999. Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus document. *British Journal of Nutrition*. 81: S1-S27.
- EL RAYESS, Y., ALBASI, C., BACCHIN, P., TAILLANDIER, P., MIETTON-PEUCHOT, M. & DEVATINE, A.** 2012. Analysis of membrane fouling during cross-flow microfiltration of wine. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 16: 398-408.
- ENOTECNICA PILLAN.** 2013. Water Presses. Italia. INTERNET. <http://www.enotecnicapillan.it/ing/idropresse.htm> (19/05/14).
- GANCEL, A. L., FENEUIL, A., ACOSTA, O. PÉREZ, A. M. & VAILLANT, F.** 2011. Impact of industrial processing and storage on major polyphenols and the antioxidant capacity of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichus*). *Food Research International*. 44(7): 2243-2251.
- GRASSIN, C. & FAUGUENBERGUE, P.** 1999. Enzymes, fruit juice processing. *In* M.C. Flickinger & S.W. Drew, eds. Encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis and bioseparation. John Wiley & Sons. Nueva York. Pp. 1030-1061.
- GUIZARD, C. & AMBLARD, P.** 2009. Current status and prospects for ceramic membrane applications. *In* A.K. Pabby, S.S.H, Rizvi & A. M. Sastre, eds. Handbook of membrane separations: chemical, pharmaceutical, food and biotechnological applications. CRC Press, Florida. Pp.140-179.
- HACH COMPANY.** 2013. 2100 Series laboratory turbidimeters data sheet. Colorado. INTERNET. <http://www.hach.com/2100an-laboratory-turbidimeter-epa-115-vac/product-downloads?id=7640450972> (17/08/13).

- HAGER, A., HOWARD, L. R., PRIOR, R. L. & BROWNMILLER, C.** 2008. Processing and storage effects on monomeric anthocyanins, percent polymeric color, and antioxidant capacity of processed black raspberry products. *Journal of Food Science*. 73(6): H134-H140.
- HEBER, D.** 2008. Multitargeted therapy of cancer by ellagitannins. *Cancer Letters*. 269: 262-268.
- HENSLEY, K., ROBINSON, K.A., PRASAD, S., SALSMAN, S. & FLOYD, R. A.** 2000. Reactive oxygen species, cell signalling and cell injury. *Free Radical Biology & Medicine*. 28(10): 1456-1462.
- HÖHN, A., SUN, D. & NOLLE, F.** 2005. Enzymes in the fruit juice and wine industry. *In* D.M. Barret, L.P. Somogyi & H.S. Ramaswamy, eds. *Processing fruits: science and technology*. 2<sup>da</sup> ed. CRC Press, Florida. Pp. 97-112.
- HORVÁTH-KERKAI, E.** 2006. Manufacturing fruit beverages. *In* Y.H., Hui, ed. *Handbook of fruits and fruit processing*. Blackwell Publishing, Iowa. Pp.205-215.
- HUANG, D., OU, B. & PRIOR, R.L.** 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 1841-1856.
- HUANG, J., SHI, L., ZENG, G., LI, X., HE, S., LI, F., XIONG, Y., GUO, S., ZHANG, D. & XIE, G.** 2012. Effects of feed concentration and transmembrane pressure on membrane fouling in Cd<sup>2+</sup> removal by micellar enhanced ultrafiltration. *Desalination*. 294: 67-73.
- HUNG, H., JOSHIPURA, K.J., JIANG, R., HU, F.B., HUNTER, D., SMITH-WARNER, S. A., COLDITZ, G. A., ROSNER, B., SPIEGELMAN, D. & WILLETT, W.** 2004. Fruit and vegetable intake and risk of mayor chronic disease. *Journal of National Cancer Institute*. 96(21): 1577-1584.

- KAHN, R. S., GRIGOR, J., WINGER, R. & WIN, A. 2013.** Functional product development: opportunities and challenges for manufactures. Trends in Food Science and Technology. 30:27-37.
- KAUR, S., SARKAR, B. C. & SHARMA, H. K. 2009.** optimization of enzymatic hydrolysis pretreatment conditions for enhanced juice recovery from guava fruit using response surface methodology. Food and Bioprocess Technology. 2: 96-100.
- KOPPER, M. 2012.** 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. Tesis de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos. Universidad de Costa Rica, Escuela de Tecnología de Alimentos. San José.
- 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 and Emerging Technologies. 8:135-142.
- LANDETE, J.M. 2011.** Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: a review about source, metabolism, functions and health. Food Research International. 44: 1150-1160.
- LARROSA, M., GARCÍA-CONESA, M.T., ESPÍN, J.C. & TOMÁS-BARBERÁN, F.A. 2010.** Ellagitanins, ellagic acid and vascular health. Molecular Aspects of Medicine. 31:513-519.
- LEE, J., DOSSETT, M. & FINN, C.E. 2012.** *Rubus* fruit phenolic content research: the good, the bad and the confusing. Food Chemistry. 130:785-796.
- LEE, W.C., YUSOF, S., HAMID, N.S.A. & BAHARIN, B. S. 2006.** Optimizing conditions for enzymatic clarification of banana juice using response surface methodology. Journal of Food Engineering. 73(1):55-63.

- LIEW ABDULLAH, A.G., SULAIMAN, N. M., AROUA, M.K. & MEGAT MOHD NOOR, M. J.** 2007. Response surface optimization of conditions for clarification of carambola juice using a commercial enzyme. *Journal of Food Engineering*. 81:65-71.
- LIYANNA-PATHIRANA, C. & SHAHIDI, F.** 2005. Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Food Chemistry*. 93:47-56.
- MARTINO, V., MORALES, J., MARTÍNEZ-IRUJO, J.J., FONT, M., MONGE, A. & COUSSIO, J.** 2004. Two ellagitannins from the leaves of *Terminalia triflora* with inhibitory activity on HIV-1 reverse transcriptase. *Phytotherapy Research*. 18(8):667-669.
- McLELLAN, M. R., & PADILLA-ZAKOUR, O. I.** 2005. Juice processing. *In* D.M. Barret, L.P. Somogyi & H.S. Ramaswamy, eds. *Processing fruits: science and technology*. 2<sup>da</sup> ed. CRC Press, Florida. p.74-96.
- MENG, L., LOZANO, Y., BOMBARDA, I., GAYDOU, E. & LI, B.** 2006. anthocyanin and flavonoid production from *Perilla frutescens*: pilot plant scale processing including cross-flow microfiltration and reverse osmosis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54:4297-4303.
- MENRAD, K.** 2003. Market and marketing of functional foods in Europe. *Journal of Food Engineering*. 56:181-188.
- MERTZ,C., CHEYNIER, V., GÜNATA, Z. & BRAT, P.** 2007. analysis of phenolic compounds in two blackberry (*Rubus glaucus* and *Rubus adenotrichus*) by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ion trap mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55(21):8616-8624.



- MEYDANI, M.** 2000. Effect of functional food ingredients: vitamin E modulation of cardiovascular diseases and immune status in the elderly. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 71(6):1665s-1668s.
- MONTERO, M.** 2008. Estudio del proceso para la elaboración de jugo clarificado de mora por microfiltración tangencial. Tesis de Licenciatura en Tecnología de Alimentos. Universidad de Costa Rica, Escuela de Tecnología de Alimentos. San José.
- MURILLO, C. & ARIAS, R.** 2005. Estudio de la oferta y demanda de bienes y servicios basados en recursos biológicos nacionales. CINPE. Heredia. INTERNET. [http://www.inbio.ac.cr/pdf/biocomercio/EstudioCINPE-UNA/Biocomercio%20CINPE-INBIO\\_FINAL.pdf](http://www.inbio.ac.cr/pdf/biocomercio/EstudioCINPE-UNA/Biocomercio%20CINPE-INBIO_FINAL.pdf) (30/12/13).
- NIKI, E. & NOGUCHI, N.** 2000. Evaluation of antioxidant capacity: what capacity is being measured by which method?. *IUBMB Life*. 50(5):323-329.
- OBÓN, J.M., CASTELLAR, M. R., ALACID, M. & FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.A.** 2009. Production of a red-purple food colorant from *Opuntia stricta* fruits by spray drying and its application in food model systems. *Journal of Food Engineering*. 90:471-479.
- ORTIZ, M.J., VÉLEZ, C.A. & MEJÍA, E.F.** 2008. Modelos matemáticos de la colmatación de membranas en microfiltración tangencial. *Revista Ingeniería e Investigación*. 28(1):123-132.
- PACHECO-PALENCIA, L.A., HAWKEN, P. & TALCOTT, S.T.** 2007. Phytochemical, antioxidants and pigment stability of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) as affected by clarification, ascorbic acid fortification and storage. *Food Research International*. 40(5): 620-28.
- PAGLIERO, C., OCHOA, N. A. & MARCHESI, J.** 2011. orange juice clarification by microfiltration: effect of operational variables on membrane fouling. *Latin American Applied Research*. 41:279-284.

- PAINTER, P.C. & COLEMAN, M.M.** 2009. Essentials of Polymer Science and Enigeneering. DEStech Publications, Pennsylvania.
- PÉREZ, A. M. & VAILLANT, F.** 2003. Aplicación de la microfiltración tangencial a la obtención de jugos de frutas clarificados. Alimentaria. 68:21-24.
- PUUPPONEN-PIMIÄ, R., NOHYNEK, L., AMMANN, S., OKSMAN-CALDENTY, K. & BUCHERT, J.** 2008. Enzyme assisted processing increases antimicrobial and antioxidant activity of bilberry. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 56:681-688.
- RAI, P., MAJUMDAR, G. C., DASGUPTA, S. & DE, S.** 2004. Optimizing pectinase usage in pretreatment of mosambi juice for clarification by surface response methodology. Journal of Food Engineering. 64:397-403.
- RASTOGI, N.K. & RASHMI, K.R.** 1999. Optimisation of enzymatic liquefaction of mango pulp by response surface methodology. European Food Reseach and Technology. 209:57-62.
- ROBERFROID, M. B.** 2000. A European consensus of scientific concepts of functional foods. Nutrition. 16(8):689-691.
- SEERAM, N.P.** 2008. berry fruits for cancer prevention: current status and future prospects. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 56:630-635.
- SHARMA, A.K., SARKAR, B.C. & SHARMA, H.K.** 2005. Optimization of enzymatic parameters for increased juice yield from carrot (*Daucus carota* L.) using response surface methodology. European Food Research and Technology. 221:106-112
- SIN, H.N., YUSOF, S., SHEIKH ABDUL HAMID, N. & RAHM, R. A.** 2006. Optimization of enzymatic clarification of sapodilla juice using response surface methodology. Journal of Food Engineering. 73:313-319.

- SIRÓ, I., KÁPOLNA, E., KÁPOLNA, B. & LUGASI, A.** 2008. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance: a review. *Appetite*. 51:456-467.
- SOTO, M.** 2010. Evaluación del efecto de tratamientos físicos acoplados a un tratamiento enzimáticos sobre las propiedades físico-químicas y el contenido de compuestos antioxidantes de jugo de mora. Tesis de Licenciatura en Tecnología de Alimentos. Universidad de Costa Rica, Escuela de Tecnología de Alimentos. San José.
- 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*. 41:1082-1089.
- STRIK, B. C., CLARK, J. R., FINN, C. E. & BAÑADOS, M. P.** 2007. comprehensive crop reports: worldwide blackberry production. *HortTechnology*. 17(2):205-213.
- TÉLESPHORE, M. & HE, Q.** 2009. Optimization of processing parameters for cloudy passion fruit juice processing using pectolytic and amylolytic enzymes. *Pakistan Journal of Nutrition*. 8(11):1806-1813.
- USHIKUBO, F.Y., WATANABE, A.P. & VIOTTO, L.A.** 2007. Microfiltration of umbu (*Spondias tuberosa Arr. Cam.*) juice. *Journal of Membrane Science*. 288(2): 61-66.
- VAILLANT, F., MILLAN, A., DORNIER, M., DECLoux, M. & REYNES, M.** 2001. Strategy for the economical optimisation of the clarification of pulpy juices using crossflow microfiltration. *Journal of Food Engineering*. 48(1): 83-90.
- VAILLANT, F., MILLAN, P., O´BRIEN, G., DORNIER, M. & REYNES, M.** 1999. Crossflow microfiltration of passion fruit juice after partial enzymatic liquefaction. *Journal of Food Engineering*. 42(4): 215-224.

- 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(1): 404-412.
- VASCO, C., RUALES, J. & KAMAL-ELDIN, A.** 2008. Total phenolic compounds and antioxidant capabilities of major fruits from Ecuador. *Food Chemistry*. 11:816-823.
- VERBEKE, W.** 2005. Consumer acceptance of functional foods: socio-demographic, cognitive and attitudinal determinants. *Food Quality and Preference* 16:45-57.
- VLADISAVLJEVIĆ, G.T., VUKOSAVLJEVIĆ, P. & BUKVIĆ.** 2003. Permeate flux and fouling resistance in ultrafiltration of depectinized apple juice using ceramic membranes. *Journal of Food Engineering*. 60:241-247.
- WOOTTON-BEARD, P.C. & RYAN, L.** 2011. Improving public health? the role of antioxidant-rich fruit and vegetable beverages. *Food Research International*. 44:3135-3148.
- WU, P. & IMAI, M.** 2012. Novel Biopolymer Composite Membrane Involved with Selective Mass Transfer and Excellent Water Permeability. *In* R.Y. Ning, ed. *Advancing Desalination*. INTERNET. <http://www.intechopen.com/books/advancing-desalination/novel-biopolymer-composite-membrane-involved-with-selective-mass-transfer-and-excellent-water-permea> (10/05/14)

## VIII. Anexos

### 8.1 Características de los enzimáticos utilizados

**Cuadro AI.** Características de los preparados enzimáticos evaluados para determinar el efecto sobre el rendimiento, turbidez y sólidos insolubles en suspensión, del jugo pulposo de mora.

Preparado enzimático	Actividades reportadas	Precio (\$/L)
(A)	Pectino liasa, celulasa, poligalacturinasa	28,25
(B)	Poligalacturonasa, Pectinasa <sup>a</sup> , xilanasa <sup>a</sup> , celulasa <sup>a</sup>	41,10
(C)	Pectino liasa, poligalacturonasa	37,67

<sup>a</sup>Dalal *et al* (2007).

### 8.2 ANDEVA para los resultados de la caracterización del proceso en la empresa

**Cuadro AII.** ANDEVA para la Turbidez de los jugos en distintas etapas del proceso.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	F	Probabilidad
<b>Etapas del Proceso</b>	3	550,6145	<0,0001*
<b>Error</b>	8		
<b>Total</b>	11		

\*Significativo

**Cuadro AIII.** ANDEVA para el porcentaje SIS de los jugos en distintas etapas del proceso.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	F	Probabilidad
<b>Etapa del Proceso</b>	3	40,0876	<0,0001*
<b>Error</b>	7		
<b>Total</b>	10		

\*Significativo

**Cuadro AIV.** ANDEVA para los grados Brix de los jugos en distintas etapas del proceso.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	F	Probabilidad
<b>Etapa del Proceso</b>	3	62,0667	<0,0001*
<b>Error</b>	8		
<b>Total</b>	11		

\*Significativo

**Cuadro AV.** ANDEVA para el parámetro de color L\* de los jugos en distintas etapas del proceso.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	F	Probabilidad
<b>Etapa del Proceso</b>	3	133639,5	<0,0001*
<b>Error</b>	8		
<b>Total</b>	11		

\*Significativo

**Cuadro AVI.** ANDEVA para el parámetro de color a\* de los jugos en distintas etapas del proceso.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	F	Probabilidad
<b>Etapa del Proceso</b>	3	79209,73	<0,0001*
<b>Error</b>	8		
<b>Total</b>	11		

\*Significativo

**Cuadro AVII.** ANDEVA para el parámetro de color b\* de los jugos en distintas etapas del proceso.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	F	Probabilidad
<b>Etapa del Proceso</b>	3	105261,9	<0,0001*
<b>Error</b>	8		
<b>Total</b>	11		

\*Significativo

**Cuadro AVIII.** ANDEVA para el parámetro de color DE de los jugos en distintas etapas del proceso.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	F	Probabilidad
<b>Etapa del Proceso</b>	3	36242,88	<0,0001*
<b>Error</b>	8		
<b>Total</b>	11		

\*Significativo

**Cuadro AIX.** ANDEVA para el pH de los jugos en distintas etapas del proceso.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	F	Probabilidad
<b>Etapa del Proceso</b>	3	33,2222	<0,0001*
<b>Error</b>	8		
<b>Total</b>	11		

\*Significativo

### 8.3 ANDEVA para los distintos métodos de extracción en la planta piloto del CITA.

**Cuadro AX.** ANDEVA para el Porcentaje de rendimiento de los jugos en distintos métodos de extracción.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	F	Probabilidad
<b>Tratamiento</b>	3	25,5295	<0,0001*
<b>Error</b>	11		
<b>Total</b>	14		

\*Significativo

**Cuadro AXI.** ANDEVA para el porcentaje de SIS de los jugos en distintos métodos de extracción.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	F	Probabilidad
<b>Tratamiento</b>	4	11,3970	<0,0001*
<b>Error</b>	22		
<b>Total</b>	26		

\*Significativo

#### 8.4 ANDEVA para los parámetros evaluados durante la selección del preparado enzimático óptimo

**Cuadro AXII.** ANDEVA para el porcentaje de Rendimiento de los jugos con distintos preparados enzimáticos.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	F	Probabilidad
Preparado Enzimático	3	0,1471	0,9287
Error	8		
Total	11		

**Cuadro AXIII.** ANDEVA para el porcentaje de SIS de los jugos con distintos preparados enzimáticos.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	F	Probabilidad
Preparado Enzimático	3	9,5378	0,0051*
Error	8		
Total	11		

\*Significativo

**Cuadro AXIV.** ANDEVA para la turbidez de los jugos con distintos preparados enzimáticos.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	F	Probabilidad
Preparado Enzimático	3	0,5275	0,6757
Error	8		
Total	11		



**8.5 ANDEVA para las prueba preliminar para la Optimización las condiciones del tratamiento enzimático (tiempo y concentración del preparado enzimático) utilizando el preparado preseleccionado, para dos tipos de jugo de mora**

**Cuadro AXV.** ANDEVA para la viscosidad con jugo prensado realizando los tratamientos de los puntos axiales.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	F	Probabilidad
Tratamiento	3	161,9719	<0,0001*
Error	20		
Total	23		

\*Significativo

**Cuadro AXVI.** ANDEVA para la turbidez con jugo prensado realizando los tratamientos de los puntos axiales.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	F	Probabilidad
Tratamiento	3	5,7562	0,0052*
Error	20		
Total	23		

\*Significativo

**Cuadro AXVII.** ANDEVA para la viscosidad con jugo pulposo realizando los tratamientos de los puntos axiales.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	F	Probabilidad
Tratamiento	3	8,7856	0,0029*
Error	11		
Total	14		

\*Significativo

**Cuadro AXVIII.** ANDEVA para la turbidez con jugo pulposo realizando los tratamientos de los puntos axiales.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	F	Probabilidad
Tratamiento	3	0,2013	0,8943
Error	20		
Total	23		

**Cuadro AXIX.** ANDEVA para el porcentaje de rendimiento con jugo pulposo realizando los tratamientos de los puntos axiales.

<b>Fuente de Variación</b>	<b>Grados de Libertad</b>	<b>F</b>	<b>Probabilidad</b>
<b>Tratamiento</b>	3	1,6952	0,3047
<b>Error</b>	4		
<b>Total</b>	7		

**Cuadro AXX.** ANDEVA para el porcentaje de SIS con jugo pulposo realizando los tratamientos de los puntos axiales.

<b>Fuente de Variación</b>	<b>Grados de Libertad</b>	<b>F</b>	<b>Probabilidad</b>
<b>Tratamiento</b>	3	1,3678	0,3728
<b>Error</b>	4		
<b>Total</b>	7		

**\*Significativo**

### 8.6 Resultados de las variables respuesta para cada una de las superficies de respuesta con jugo pulposo y jugo prensado

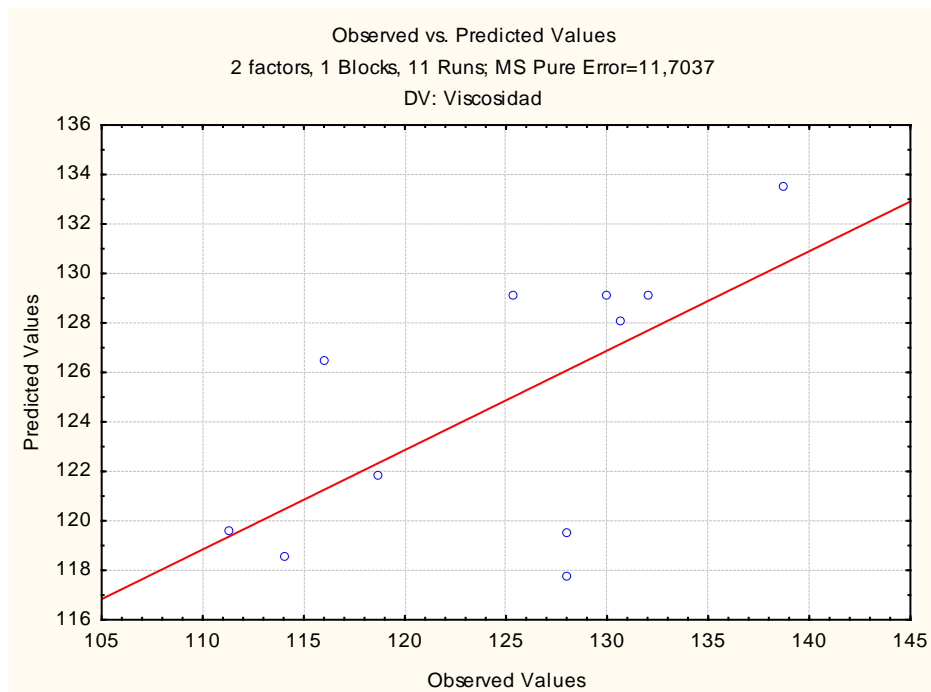
**Cuadro AXXI.** Efecto del tiempo de incubación y la concentración de enzima sobre la viscosidad y la turbidez del jugo pulposo de mora con un 23,64% de SIS.

Tratamiento	Viscosidad (cP)	Turbidez (NTU)
	( $y_1$ )	( $y_2$ )
$C_0T_0$	130	10363
$C_1T_1$	114	11607
$C_0T_{\sqrt{2}}$	128	11610
$C_1T_{-1}$	128	9513
$C_{\sqrt{2}}T_0$	119	11233
$C_{-\sqrt{2}}T_0$	139	9530
$C_0T_0$	125	10230
$C_{-1}T_{-1}$	131	9843
$C_{-1}T_1$	116	10637
$C_0T_0$	132	11543
$C_0T_{-\sqrt{2}}$	111	9910

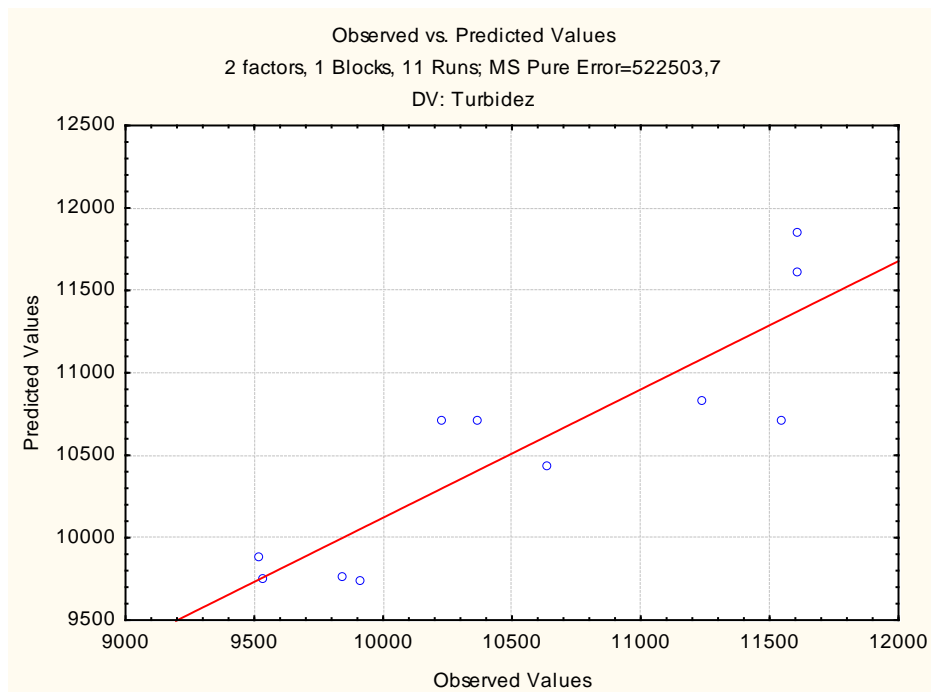
**Cuadro AXXII.** Efecto del tiempo de incubación y la concentración de enzima sobre la viscosidad y la turbidez del jugo prensado.

Tratamiento	Viscosidad (cP)	Turbidez (NTU)
	( $y_1$ )	( $y_2$ )
$C_{-1}T_{-1}$	1,22	399
$C_0T_0$	1,25	355
$C_0T_{-\sqrt{2}}$	1,20	356
$C_0T_0$	1,25	422
$C_1T_1$	1,24	448
$C_{-1}T_1$	1,31	437
$C_0T_{\sqrt{2}}$	1,15	442
$C_0T_0$	1,26	336
$C_{\sqrt{2}}T_0$	1,25	373
$C_{-\sqrt{2}}T_0$	1,41	356
$C_1T_{-1}$	1,27	342

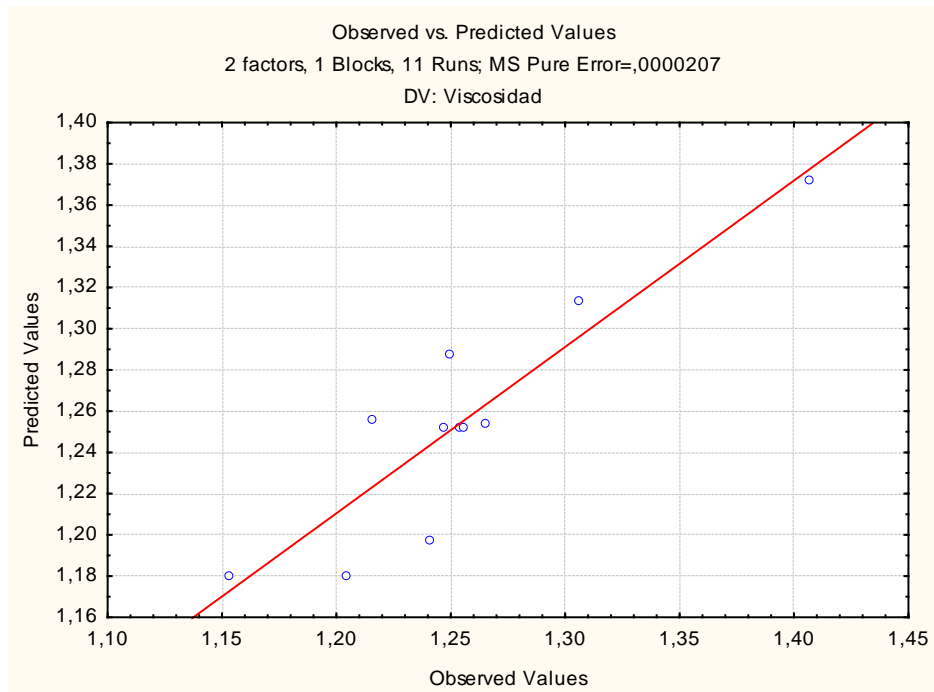
**8.7 Gráficas de residuos para cada una de las variables respuesta par a las superficies de respuesta con jugo pulposo y jugo prensado.**



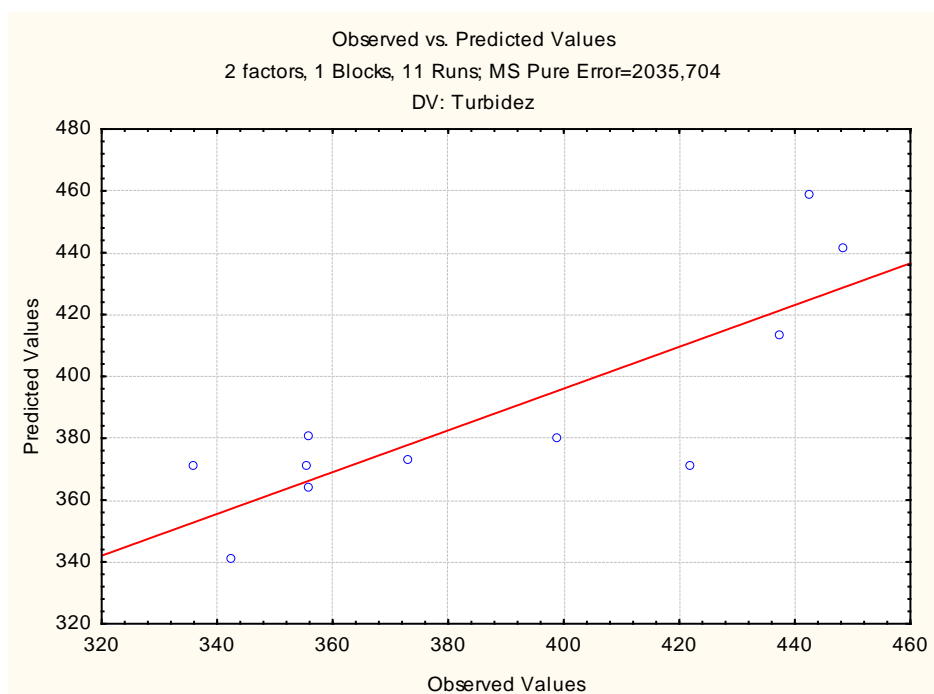
**Figura AI.** Gráfico de residuos (Valores Predichos vs. Valores Observados) para el modelo generado para la viscosidad del jugo pulposo de mora con 23,64% de SIS.



**Figura AII.** Gráfico de residuos (Valores Predichos vs. Valores Observados) para el modelo generado para la turbidez del jugo pulposo de mora con 23,64% de SIS.



**Figura AIII.** Gráfico de residuos (Valores Predichos vs. Valores Observados) para el modelo generado para la viscosidad del jugo prensado de mora.



**Figura AIV.** Gráfico de residuos (Valores Predichos vs. Valores Observados) para el modelo generado para la turbidez del jugo prensado de mora.

### 8.8 Prueba t para la corroboración de resultados de la superficie de respuesta de jugo prensado

**Cuadro AXXIII.** Prueba t de Student para viscosidad, para resultados predichos y obtenidos.

	Diferencia	Prueba t	Grados de libertad	Probabilidad >  t
<b>Estimado</b>	0,01667	1,581139	2	0,2002
<b>Error estándar</b>	0,01054			

### 8.9 ANDEVA para los flujos de permeado según el tipo de procesamiento de los 15 a los 45 y a varios rangos de FRV

**Cuadro AXXIV.** ANDEVA de los Flujos de permeado de los 15 a los 45 minutos con distintas metodologías de procesamiento.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	F	Probabilidad
<b>Tratamiento</b>	2	672,9405	<0,0001*
<b>Error</b>	182		
<b>Total</b>	184		

\*Significativo

**Cuadro AXXV.** ANDEVA de los Flujos de permeado de un FRV de 1 a uno de 3 con distintas metodologías de procesamiento.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	F	Probabilidad
<b>Tratamiento</b>	2	142,2053	<0,0001*
<b>Error</b>	90		
<b>Total</b>	92		

\*Significativo

**Cuadro AXXVI.** ANDEVA de los Flujos de permeado de un FRV de 3 a uno de 5 con distintas metodologías de procesamiento.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	F	Probabilidad
<b>Tratamiento</b>	2	435,2820	<0,0001*
<b>Error</b>	110		
<b>Total</b>	112		

\*Significativo

**Cuadro AXXVII.** ANDEVA de los Flujos de permeado de un FRV de 5 a uno de 7 con distintas metodologías de procesamiento.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	F	Probabilidad
Tratamiento	2	1742,913	<0,0001*
Error	104		
Total	106		

\*Significativo

### 8.10 Características de los jugos en distintas etapas del proceso durante los ensayos de larga duración de MFT de jugo de mora.

**Cuadro AXXVIII.** Viscosidad, turbidez, grados Brix y pH, para la materia prima, retenido y permeado en distintas etapas del ensayo de larga duración de MFT de mora.

Parámetro	Materia Prima	Permeado FRV 20	Permeado Final	Retenido FRV 20	Retenido Final
Viscosidad	12,0±1,3 <sup>b</sup>	8,8±0,3 <sup>a</sup>	8,3±0,3 <sup>a</sup>	12,3±0,7 <sup>b</sup>	12,7±1,3 <sup>b</sup>
Turbidez	611±546	0,666±0,158	0,851±0,139	27538±20459	31893±21867
°Brix	10,42±1,14	8,75±2,45	7,83±0,33	9,75±1,80	9,58±1,47
pH	2,82±0,11	2,85±0,08	2,84±0,11	2,82±0,09	2,82±0,12

Nota: En una misma fila valores con letras diferentes indican una diferencia significativa según la prueba de Tukey ( $p \leq 0,05$ ), los resultados se presentan con un intervalo de confianza de un 95% ( $n=2$ ).

### 8.11 ANDEVAS para características de las muestra obtenidas durante los ensayos de larga duración de MFT de jugo de mora.

**Cuadro XXIX.** ANDEVA de la viscosidad de los de la materia prima, retenido y permeado en distintas etapas del ensayo de larga duración de MFT de mora.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	F	Probabilidad
Tratamiento	4	19,7477	0,0029*
Error	5		
Total	9		

\*Significativo

**Cuadro XXX.** ANDEVA de la turbidez de los de la materia prima, retenido y permeado en distintas etapas del ensayo de larga duración de MFT de mora.

<b>Fuente de Variación</b>	<b>Grados de Libertad</b>	<b>F</b>	<b>Probabilidad</b>
<b>Tratamiento</b>	4	5,6469	0,0426
<b>Error</b>	5		
<b>Total</b>	9		

**Cuadro XXXI.** ANDEVA de los grados Brix de los de la materia prima, retenido y permeado en distintas etapas del ensayo de larga duración de MFT de mora.

<b>Fuente de Variación</b>	<b>Grados de Libertad</b>	<b>F</b>	<b>Probabilidad</b>
<b>Tratamiento</b>	4	1,4843	0,3331
<b>Error</b>	5		
<b>Total</b>	9		

**Cuadro XXXII.** ANDEVA del pH de los de la materia prima, retenido y permeado en distintas etapas del ensayo de larga duración de MFT de mora.

<b>Fuente de Variación</b>	<b>Grados de Libertad</b>	<b>F</b>	<b>Probabilidad</b>
<b>Tratamiento</b>	4	0,0671	0,9892
<b>Error</b>	5		
<b>Total</b>	9		

**\*Significativo**



## 8.12 Procedimiento de la limpieza membrana de cerámica

### Cuadro AXXXIII. Enjuague con agua.

Sustancia	Tiempo (min)	Presión bomba neumática (psi)	Temperatura (°C)	Procedimiento	Observaciones
-	-	-	-	Terminado el proceso de MFT, cierre la válvula de permeado, abra la válvula de retenido y espere a que no salga más fluido. Cierre la válvula de retenido	Recoja el retenido en un recipiente
Agua	15	40	60	Llene el sistema con agua, abrir la válvula del reciclo y drene el sistema	Utilice agua suavizada*
Agua	1	40	60	Cierre la válvula del reciclo, espere el tiempo establecido	Utilice agua suavizada
Agua	5	40	60	Abra la válvula del retenido y drene el sistema.	Utilice agua suavizada
Agua	10	40	60	Cierre la válvula del retenido y abra la de permeado, drene el sistema	Utilice agua suavizada. Verifique: a) pH del agua ( $\pm 1$ unidad del pH del agua suavizada). b) flujo de agua no esté turbia**
-	-	-	-	Apague la bomba centrífuga y luego la bomba neumática. Drene el sistema con la válvula del retenido y la del reciclo abiertas	-

\* La temperatura no debe de cambiar repentinamente (choque térmico). El calentamiento se hará recirculando el líquido por la membrana. El gradiente de temperatura debe ser de 10 °C por minuto.

\*\* Si el agua se ve turbia o el pH está fuera de los límites ( $\pm 1$  unidad del pH del agua utilizada), repita el enjuague nuevamente con agua durante otros 5 min. Verifique el pH y la turbidez. Si el equipo no se ha enjuagado correctamente repita lo anterior las veces que sean necesarias.

**Cuadro AXXXIV.** Lavado Alcalino.

Sustancia	Tiempo (min)	Presión bomba neumática (psi)	Temperatura (°C)	Procedimiento	Observaciones
Disolución básica (Hipoclorito de sodio NaOCl 500 ppm; Hidróxido de sodio NaOH 1% m/m)	20	40	60	Llene el sistema, coloque la manguera del reciclo en la marmita y recircule por el tiempo establecido	Se utilizan alrededor de 18L de agua (un balde grande lleno) Utilice 182,0 g de NaOH y 76 mL de cloro 12% en 18 L*
-	-	-	-	Apague la bomba centrífuga y luego la bomba neumática. Drene el sistema con la válvula del retenido y la del reciclo abiertas	Deseche la disolución en el balde de neutralización
Disolución básica (Hidróxido de sodio NaOH 2% m/m)	30	40	60	Llene el sistema, coloque la manguera del reciclo en la marmita y recircule por el tiempo establecido	Se utilizan alrededor de 18L de agua (un balde grande lleno) Utilice 364,0 g de NaOH en 18 L*
Disolución básica (Hidróxido de sodio NaOH 2% m/m)	1	40	60	Cierre la válvula del reciclo, espere el tiempo establecido	Utilice la solución anterior
Disolución básica (Hidróxido de sodio NaOH 2% m/m)	30	40	60	Cierre la válvula del reciclo y abra lentamente la válvula de permeado, recircule por 30 min	Utilice la solución anterior
-	-	-	-	Apague la bomba centrífuga y luego la bomba neumática. Drene el sistema con la válvula del retenido y la del reciclo abiertas	Deseche la disolución en el balde de neutralización
Agua	15	40	ambiente	Llene el sistema con agua, abra la válvula del reciclo y drene	Utilice agua suavizada

Cuadro AXXXIV. Continuación.

Sustancia	Tiempo (min)	Presión bomba neumática (psi)	Temperatura (°C)	Procedimiento	Observaciones
Agua	1	40	ambiente	Cierre la válvula del reciclo, espere el tiempo establecido	Utilice agua suavizada
Agua	15	40	ambiente	Cierre la válvula del reciclo y abra la de permeado, drene el sistema	Utilice agua suavizada. Verifique: a) pH del agua ( $\pm 1$ unidad del pH del agua suavizada). b) flujo de agua no esté turbia**
-	-	-	-	Apagar la bomba centrífuga y luego la bomba neumática. Drenar el sistema con la válvula del retenido y la del reciclo abiertas	-
<p>* La temperatura no debe de cambiar repentinamente (choque térmico). El calentamiento se hará recirculando el líquido por la membrana. El gradiente de temperatura debe ser de 10 °C por minuto.</p> <p>** Si el agua se ve turbia o el pH está fuera de los límites (<math>\pm 1</math> unidad del pH del agua utilizada), repetir el enjuague nuevamente con agua durante otros 5 min. Verifique el pH y la turbidez. Si el equipo no se ha enjuagado correctamente repita lo anterior las veces que sean necesarias.</p>					

Cuadro AXXXV. Lavado Ácido.

Sustancia	Tiempo (min)	Presión bomba neumática (psi)	Temperatura (°C)	Procedimiento	Observaciones
Disolución ácida (Ácido nítrico $\text{HNO}_3$ 1% m/m)	15	40	60	Llenar el sistema, colocar la manguera del reciclo en la marmita y recircular por el tiempo establecido	Se utilizan alrededor de 18L de agua (un balde grande lleno) Utilice 261,0 g de $\text{HNO}_3$ 70% en 18 L*
Disolución ácida (Ácido nítrico $\text{HNO}_3$ 1% m/m)	1	40	60	Cerrar la válvula del reciclo, esperar el tiempo establecido	Utilice la solución anterior

**Cuadro AXXXV.** Continuación.

Disolución ácida (Ácido nítrico HNO <sub>3</sub> 1% m/m)	15	40	60	Cerrar la válvula del reciclo y abrir lentamente la válvula de permeado, recircular por 15 min	Utilice la solución anterior
-	-	-	-	Apagar la bomba centrífuga y luego la bomba neumática. Drenar el sistema con la válvula del retenido y la del reciclo abiertas	Deseche la disolución en el balde de neutralización
Agua	15	40	ambiente	Llenar el sistema con agua, abrir la válvula del reciclo y drenar el sistema	Utilice agua suavizada
Agua	1	40	ambiente	Cerrar la válvula del reciclo, esperar el tiempo establecido	Utilice agua suavizada
Agua	15	40	ambiente	Cerrar la válvula del reciclo y abrir la de permeado, drenar el sistema	Utilice agua suavizada. Verifique: a) pH del agua ( $\pm 1$ unidad del pH del agua suavizada). b) flujo de agua no esté turbia**
-	-	-	-	Apagar la bomba centrífuga y luego la bomba neumática. Drenar el sistema con la válvula del retenido y la del reciclo abiertas	-

\* La temperatura no debe de cambiar repentinamente (choque térmico). El calentamiento se hará recirculando el líquido por la membrana. El gradiente de temperatura debe ser de 10 °C por minuto.

\*\* Si el agua se ve turbia o el pH está fuera de los límites ( $\pm 1$  unidad del pH del agua utilizada), repetir el enjuague nuevamente con agua durante otros 5 min. Verifique el pH y la turbidez. Si el equipo no se ha enjuagado correctamente repita lo anterior las veces que sean necesarias.

**Cuadro AXXXVI.** Enjuague final y Medición de la permeabilidad.

<b>Sustancia</b>	<b>Tiempo (min)</b>	<b>Presión bomba neumática (psi)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Procedimiento</b>	<b>Observaciones</b>
Agua	-	Presión de proceso	25	Realice la medición de la permeabilidad de la membrana. Si esta en un 20% por debajo de la permeabilidad original del equipo realice nuevamente el procedimiento de limpieza ya descrito	Utilice agua suavizada
Disolución desinfectante (Hipoclorito de sodio NaOCl 200 ppm)	10	40	ambiente	Llene el sistema, coloque la manguera del reciclo en la marmita y recircule por el tiempo establecido	Se utilizan alrededor de 18L de agua (un balde grande lleno) Utilice 30 mL de cloro 12% en 18 L

