

**Evaluación de la acción enzimática de
Pectinex[®] Ultra SP–L en tres tiempos de
incubación y dos diluciones para obtención de
jugo clarificado de tamarindo (*Tamarindus
indica L.*)**

Fátima Estefanía Flores Vaca

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2012

ZAMORANO
DEPARTAMENTO DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

**Evaluación de la acción enzimática de
Pectinex[®] Ultra SP–L en tres tiempos de
incubación y dos diluciones para obtención de
jugo clarificado de tamarindo (*Tamarindus
indica L.*)**

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniera en Agroindustria Alimentaria en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por:

Fátima Estefanía Flores Vaca

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2012

Evaluación de la acción enzimática de Pectinex[®] Ultra SP–L en tres tiempos de incubación y dos diluciones para obtención de jugo clarificado de tamarindo (*Tamarindus indica L.*)

Presentado por:

Fátima Estefanía Flores Vaca

Aprobado:

Jorge Cardona, Ph.D.
Asesor principal

Luis Fernando Osorio, Ph.D.
Director
Departamento de Agroindustria Alimentaria

Flor de María Núñez, M.Sc.
Asesor

Raúl Zelaya, Ph.D.
Decano Académico

RESUMEN

Flores Vaca, F.E. 2012. Evaluación de la acción enzimática de Pectinex[®] Ultra SP-L en tres tiempos de incubación y dos diluciones para obtención de jugo clarificado de tamarindo (*Tamarindus indica* L.). Proyecto especial de graduación del programa de Ingeniería en Agroindustria Alimentaria, Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Honduras. 34 p.

Tamarindo (*Tamarindus indica* L.), árbol tropical con frutos compuestos por 40% pulpa que presenta beneficios para la salud debido a los componentes en su estructura. Sin embargo, la presencia elevada de fibra en la pulpa impide su fácil procesamiento. Las enzimas pectinasas catalizan la descomposición de la pectina. El objetivo del estudio fue evaluar tres tiempos de incubación y dos diluciones (agua y pulpa) para la obtención de jugo clarificado de tamarindo. Se utilizaron dos proporciones de Agua:Pulpa (13:1 y 21:1) inoculadas con Pectinex[®] (0.1%) en 0, 2, 2.5 y 3 horas de incubación (primera fase). Posteriormente, se utilizaron dos proporciones de Agua:Pulpa (3:1 y 7:1) e incubación de 0 y 3 horas. Se utilizó BCA con arreglo factorial y tres repeticiones en ambas fases. Se realizaron análisis físico-químicos (pH, °Brix, viscosidad, color, turbidez, fenoles totales, rendimiento), análisis sensorial y de costos. Los tratamientos de mayor concentración de pulpa y 3 horas de incubación resultaron en la mayor extracción de polifenoles y rendimiento de jugo. Existió un incremento en la extracción de polifenoles de 23% (primera fase) y 20% (segunda fase) y un incremento promedio de 5 y 10.5% en el rendimiento de jugo obtenido con tratamiento enzimático en cada fase, respectivamente. La turbidez, pH, °Brix y color se vieron afectados por la dilución. El tratamiento enzimático elevó los costos variables en 65 y 73% para los tratamientos de la segunda fase, respectivamente. Se debe evaluar estos resultados a escala industrial para determinar su aplicabilidad para la Planta Hortofrutícola.

Palabras clave: Extracción de jugo, pectina, pectinasa, polifenoles totales.

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas.	ii
Resumen	iii
Contenido	iv
Índice de cuadros, figuras y anexos.....	v
1 INTRODUCCIÓN.....	1
2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	8
4 CONCLUSIONES	24
5 RECOMENDACIONES	25
6 LITERATURA CITADA.....	26
7 ANEXOS	30

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Diseño experimental de tratamientos evaluados en la primera fase.....	4
2. Diseño experimental de tratamientos segunda fase.....	4
3. Diseño experimental análisis sensorial primera fase.....	7
4. Efecto de tratamientos enzimáticos en análisis físico-químicos de jugo de tamarindo primera fase.....	9
5. Efecto de tratamientos enzimáticos en análisis de color en jugo de tamarindo primera fase.....	13
6. Coliformes fecales (NMP) en jugo de tamarindo para análisis sensorial	14
7. Resultados de prueba sensorial exploratoria y rendimiento de jugo de tamarindo primera fase.....	16
8. Efecto de tratamientos enzimáticos en análisis físico-químicos de jugo de tamarindo segunda fase	19
9. Efecto de tratamientos enzimáticos en análisis de color en jugo de tamarindo segunda fase	22
10. Costos variables para producción de jugo de tamarindo segunda fase (1 Litro).....	22
 Figuras	 Página
1. Rendimiento de los tratamientos evaluados en la prueba sensorial primera fase	15
2. Sumatoria resultados prueba sensorial de aceptación primera fase	16
 Anexos	 Página
1. Ficha Técnica enzima Pectinex [®] ULTRA SP-L	30
2. Interacción entre variables evaluadas con análisis estadístico para jugo de tamarindo primera fase.....	32
3. Interacción entre variables de prueba sensorial de aceptación y rendimiento con análisis estadístico para jugo de tamarindo	32
4. Boleta para análisis sensorial prueba de aceptación.....	33
5. Interacción entre variables evaluadas con análisis estadístico para jugo de tamarindo segunda fase	34

1. INTRODUCCIÓN

Hoy en día la gente está cada vez más preocupada por su salud y por lo que come, intentan medir sus porciones de alimentos en cada comida, beber abundante agua y hacer deporte. La Organización Mundial de la Salud - OMS (2010) en sus reportes indica que es mejor beber ocho vasos diarios de agua o comerse la fruta entera antes que tomar jugos a los que se les ha agregado azúcar durante las comidas. Además, muchos de los nutrientes y vitaminas de las frutas se pierden durante el proceso de elaboración de jugos. Otra tendencia es la innovación en los métodos para preservar alimentos y más aún las frutas y vegetales que se producen sólo en ciertas temporadas.

Según el Codex Alimentarius (2000), los jugos son líquidos sin fermentar pero fermentables que se obtienen a partir de la parte comestible de frutas maduras, frescas y mantenidas en buen estado. En ocasiones se preparan con semillas y pieles aunque pueden generar sabores adicionales desagradables en el mismo. Por lo cual, se intenta prepararlos mediante procedimientos controlados y adecuados para no afectar a las características físicas, químicas, organolépticas y nutricionales esenciales de los mismos.

Tamarindo (*Tamarindus indica* L.) es un árbol tropical y sus frutos son vainas marrones parecidas a bolsas de 15 a 17 cm de largo, constituidas de una cáscara dura de color café (FAO 2006). Contienen de 1 a 10 semillas planas y ovaladas de 1 cm de longitud donde la fibra es lo que las mantiene unidas (Parrota 1990). Específicamente, la semilla se encuentra recubierta de la pulpa, la cual es muy ácida en el caso de frutos jóvenes debido a la presencia de ácido tartárico y málico. El fruto de tamarindo está constituido por 20 a 30% de varias sustancias azucaradas y 18% corresponde a ácidos orgánicos (ácido tartárico, málico y ascórbico) medidos en base seca del fruto. Donde el 25% del total del fruto es agua y la pulpa constituye del 40 al 50% del peso de la vaina, además de que es rico en sales minerales como magnesio, potasio, hierro y fósforo (Shiu-ying 2005).

Es posible aprovechar del tamarindo tanto la madera, hojas, flores, frutos y semillas, ya que contienen gran valor nutricional y características favorables que se pueden explotar (Fraile *et al.* 2008). Sin embargo, lo que más se aprovecha es su fruto, compuesto por aproximadamente 25% cáscara, 40% pulpa y 35% de semilla (Gómez 2004). En el fruto se encuentra una gran variedad de minerales siendo el potasio el que aumenta la diuresis en las personas, la cual es utilizada como tratamiento y prevención de los cálculos renales e infecciones urinarias (Díaz 2004). Por otro lado, las infusiones de las hojas del árbol de tamarindo sirven como tratamiento para parásitos intestinales (Ronald 2007). Existen investigaciones sobre los compuestos fitoquímicos como taninos presentes en la pulpa (Parrota 1990), así como también en las semillas en polvo (López 2010) y en las hojas de tamarindo (Rodríguez *et al.* 2010).

Ciertos zumos de otras frutas como por ejemplo de manzana, para ser preferidos por el consumidor deben ser de aspecto cristalino (Panisello 2004). La separación de sólidos insolubles de jugo pulposo, se puede efectuar con la ayuda de diferentes técnicas como tratamientos enzimáticos, centrifugación, decantación y filtración frontal (Ovando y Wallszewski 2005). Una alternativa para clarificarlos es la adición de enzimas además que ayudan a disminuir la viscosidad y aumentar el porcentaje de extracción de jugo y mejorar su sabor. La pectina y el almidón son considerados sólidos insolubles causantes de la turbidez en los jugos (Vaillant 2001). Para Víctor (2005), uno de los problemas en su estudio con vino de naranja fueron las partículas sedimentadas para lo usó pectinasas y una capa filtrante de poros muy finos para no alterar la calidad sensorial del mismo.

Las enzimas pectinasas ó pectinolíticas pueden producirse mediante microorganismos de distintos grupos como hongos y levaduras, aunque las enzimas también se encuentran naturalmente en frutas y vegetales (Yegres 2001). Principalmente, son enzimas de origen microbiano (*Aspergillus niger*) que catalizan la descomposición de la pectina es decir el componente de la pared celular en las frutas (Rivera 2000). Las pectinasas se han utilizado también en el proceso de elaboración del vino desde la década de los sesenta, donde la temperatura y pH óptimos de acción son de 45 a 55 °C y 4.5 a 5.5 respectivamente (Olson 2011). De acuerdo con López *et al.* (2010), no todas las enzimas conocidas son utilizadas en procesos a nivel industrial. Debido a que las enzimas actúan a bajas concentraciones, no son tóxicas porque son específicas en su manera de actuar en un ambiente adecuado para su correcto desempeño (Rivera 2005). Sin embargo, la obtención y uso de las mismas es lo que eleva los costos de producción.

Pectinex[®] Ultra SP-L es una pectinasa que contiene principalmente poligalacturonasa, pectinliasa y pectinesterasa, siendo capaz de romper sustancias pécticas vegetales, producida por una cepa de *Aspergillus aculeatus* mediante fermentación sumergida de este microorganismo (Novozymes 2010). La pectina es un polisacárido compuesto de una cadena linear de moléculas de ácido D-galacturónico las que unidas constituyen el ácido poligalacturónico, la cual al romperse cambia las características de los alimentos (Food info 2012). Para provocar la precipitación de los coloides la pectinasa causa hidrólisis y desestabilización (Novozymes 2010), ya que por medio de su acción rompe el enlace glucosídico α (1,4) en el interior del polímero como en los extremos del mismo.

El presente estudio se enfocó en evaluar la acción enzimática de Pectinex[®] Ultra SP-L en tres tiempos de incubación y dos diluciones para obtener jugo clarificado de tamarindo (*Tamarindus indica L.*) mediante los siguientes objetivos:

- Determinar el tiempo de incubación más eficiente para obtener jugo a partir de la pulpa de tamarindo.
- Determinar las características físico-químicas del jugo obtenido.
- Determinar la aceptación sensorial de los tratamientos con mejores resultados en análisis físico-químicos.
- Determinar los costos variables de los tratamientos con mejores resultados en análisis físico-químicos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio fue dividido en dos partes debido a los resultados obtenidos de la primera fase. Después de la prueba sensorial de aceptación en la primera fase, se encontró necesario realizar una segunda fase para determinar el funcionamiento de la enzima a mayores proporciones Agua:Pulpa. Los tratamientos que tuvieron mejores resultados en los análisis físico-químicos fueron sometidos a la segunda fase del estudio donde también se les realizaron los mismos análisis que a las muestras de la primera fase para determinar el mejor tratamiento. Como complemento, se realizó un análisis de costos variables para los tratamientos evaluados en la segunda fase del estudio.

Preparación de puré. La extracción de la pulpa de tamarindo para las dos fases del estudio se llevó a cabo en la Planta Hortofrutícola de Zamorano (PHF). Las vainas de fruto de tamarindo utilizado se encontraban con su cáscara y semillas con un peso total de 25 lb. Fue necesario descascarar una por una y luego fueron pesadas obteniendo 12.6 lb de pulpa que contenía fibra y semillas. Posteriormente, se dejó en remojo durante cuatro horas a toda la pulpa en una relación de peso 1:1 de agua y pulpa con semillas. Las semillas y fibra fueron retiradas mediante presión manual y se desecharon, mientras la pulpa extraída fue empacada en bolsas de 1 lb cada una para mejor manejo de la misma, con un total de 17.3 libras de pulpa extraída de tamarindo. Después de pruebas preliminares, se determinó que la extracción óptima de jugo mediante procesos enzimáticos, debía realizarse con pulpa libre de semillas ya que éstas podían generar un sabor negativo en el producto final al ser licuadas para obtener la pulpa con la cual se prepararía el jugo. La pulpa extraída fue almacenada en la Planta de Innovación de Alimentos de Zamorano (PIA) a -15 ± 2 °C en el cuarto frío de congelación mientras se realizaban los experimentos.

Tratamiento enzimático. La pulpa extraída de tamarindo fue descongelada a temperatura ambiente (28 °C) para separarla en los distintos tratamientos en frascos de vidrio (con tapa) de 200 mL. Los tratamientos fueron seleccionados mediante pruebas preliminares ya que se observó que en medios más diluidos existía mayor interacción de la enzima con la pulpa. Por lo cual, el presente estudio constó de dos fases, donde la diferencia radicó en las diluciones Agua:Pulpa para los análisis. En la primera fase, se utilizó una proporción de 13:1 (Agua:Pulpa) como la dilución más concentrada y 21:1 (Agua:Pulpa) como la dilución menos concentrada evaluada. Cabe recalcar que éstas cantidades fueron escogidas debido a facilidades de manejo para el estudio manteniendo condiciones adecuadas del sustrato. Rastogi *et al.* (1998) aclara que la temperatura, pH, concentración de la enzima, tiempo de reacción favorecen al grado de hidrólisis y efectividad del

proceso ya que se encuentran íntimamente afectados por las condiciones del sustrato. Otros estudios determinaron que en tratamientos enzimáticos con incubación máxima de 2 horas, 500 ppm de enzima fueron suficientes para obtener mayores extracciones en la cuantificación de polifenoles totales en puré de guayaba (Mack 2011).

Mediante pruebas preliminares se estableció para este estudio el empleo de 0.1% del volumen total de la enzima comercial Pectinex[®] Ultra SP-L en cada tratamiento con tiempos de incubación de 0, 2, 2.5 y 3 horas para ambas diluciones. El tratamiento control fue el expuesto a 0 horas y sin enzima pero aforado con 0.1% de agua para remplazar el volumen que ocupa la enzima en los otros tratamientos (Cuadro 1). La pulpa con 0.1% de enzima fue incubada a baño maría con 100 mL del total de agua necesaria para el tratamiento por facilidad de manejo para las posteriores actividades. A una temperatura de 50 ± 2 °C en el “Precision – 180 series water bath” del Laboratorio de Microbiología de Alimentos de Zamorano (LMAZ).

Cuadro 1. Diseño experimental de tratamientos evaluados en la primera fase.

Dilución (Agua:Pulpa)	Incubaciones (horas)			
	0 ¹	2	2.5	3
13: 1	T ² 1	T 2	T 3	T 4
21: 1	T 5	T 6	T 7	T 8

¹Tratamiento sin enzima ni incubación. ²Tratamiento.

Para la segunda fase del estudio, de acuerdo con los resultados obtenidos en la primera fase, se tomaron de cada dilución el tratamiento que obtuvo mejores resultados con su respectivo control pero con nuevas proporciones de Agua:Pulpa. Es decir, se evaluó una proporción 3:1 (Agua:Pulpa) con un tratamiento control (sin enzima) y el mejor tratamiento de la primera fase del estudio que resultó ser el de mayor tiempo de incubación de la enzima (3 horas). Contra una proporción de 7:1 (Agua:Pulpa) y sus respectivos dos mejores tratamientos de la primera fase (control y tratamiento de 3 horas de incubación) los cuales fueron sometidos a los mismos procedimientos y análisis físico-químicos (Cuadro 2). Para la incubación se utilizó una relación de 1:1 (Agua:Pulpa) para los tratamientos en ambas fases.

Cuadro 2. Diseño experimental de tratamientos segunda fase.

Dilución (Agua:Pulpa)	Incubaciones (horas)	
	0 ¹	3
3:1	T ² 1	T 2
7:1	T 3	T 4

¹Tratamiento sin enzima ni incubación. ²Tratamiento.

Filtración. Una vez concluido el proceso de incubación en la primera fase del estudio, las muestras fueron filtradas mediante filtros elaborados con botellas de plástico de 600 mL con picos dispensadores en la parte superior. Las medidas de las mismas fueron: 8 cm de diámetro en la base, 13 cm de alto, 3 cm de alto del pico y 2.5 cm de diámetro en el mismo. Donde, se realizó un corte de la botella en la parte de la base para poder colocar las mallas filtradoras. Primero, se colocó un pedazo de la capa interna de una mascarilla de boca que según Aerokyn (2012) su casa comercial, es de polipropileno no tejido sin olor, sin fibra de vidrio y sin latex de 5 cm ancho $\times$ 7.5 cm de largo el cual fue sujetado con la misma tapa. Luego, se colocó en el interior del pico algodón para cubrir la parte interior del cuello de la botella. Finalmente, se colocó un círculo de 7 cm de radio de tela para filtrado utilizada en la PHF para filtración de vinagre, con un corte triangular desde el radio hasta 2 cm en la circunferencia de la tela para mejor adaptación a la botella. Al culminar el tiempo de incubación, en el Laboratorio de Análisis de Alimentos de Zamorano (LAAZ), se procedió con el filtrado de los 100 mL de agua con pulpa y enzima, mientras que el resto de agua se pasó por el filtro poco a poco con el objetivo de realizar posteriores lavados a la pulpa incubada y se mezcló ligeramente para no desubicar a las capas del mismo.

El mismo procedimiento fue realizado para las muestras de la segunda fase del estudio donde con las otras partes de agua restantes, se realizaron los lavados a la pulpa incubada, es decir se colocaron las dos partes de agua restantes para obtener la proporción final de 3:1 y las seis partes restantes de agua para obtener la proporción final de 7:1.

Rendimiento del jugo. Se realizaron mediciones volumétricas de la cantidad de jugo extraído a cada uno de los tratamientos luego de la incubación y primer filtrado para las muestras de ambas fases del estudio. Los datos fueron reportados en porcentaje comparado con el volumen total de jugo extraído.

pH. El nivel de pH de los jugos filtrados de las dos fases del estudio fue medido en el LMAZ mediante el potenciómetro Thermo Scientific – Orion 5 Star, calibrado diariamente con buffers de pH de 4.01, 7 y 10.01. Los resultados fueron reportados en valores de pH.

Sólidos solubles totales. Los sólidos solubles totales de las muestras de jugo de ambas fases fueron medidos mediante el refractómetro Atago, “Pocket” PAL – α con un rango de 0 a 80° Brix a 20 °C (AOAC 1997). Los resultados fueron reportados en porcentaje de °Brix.

Viscosidad. A las muestras de ambas fases se les realizaron mediciones de viscosidad en el LAAZ mediante el Reómetro Brookfield DV-III Ultra con el usillo 6 (LV1) a una velocidad de 125 rpm a 22.35 ± 0.91 °C, en un beaker Pyrex con 600 mL de jugo de tamarindo filtrado. Los resultados fueron reportados en Pa·s (pascal por segundo).

Polifenoles solubles totales. Los polifenoles solubles totales de las muestras de ambas fases fueron medidos en el LAAZ por el método Folin-Ciocalteu explicado por Talcott (2003) donde se emplearon soluciones Folin - Ciocalteu (FC) a 0.25 N y carbonato de sodio (Na_2CO_3) a 1 M. Las muestras de jugo de tamarindo se diluyeron a 5X y se colocaron 100 μL en tubos de ensayo de vidrio por duplicado para cada muestra, tomando como blanco 100 μL de agua destilada con los reactivos antes mencionados. Luego, se colocaron en cada tubo 500 μL de reactivo FC y se dejó reposar durante 3 minutos con agitación. Posteriormente, se adicionó 500 μL de carbonato de sodio a 1 M y se dejó reposar durante 7 minutos. Finalmente, se completó el volumen con 3 mL de agua destilada en cada tubo de ensayo dejándose reposar durante 45 minutos. Luego de este periodo, se midió la absorbancia en el espectrofotómetro Spectronic 20 a una longitud de onda de 726 nm. Se utilizó como curva estándar ácido gálico para cuantificar los fenoles totales y se reportaron como mg/L (ppm) en equivalente de ácido gálico (EAG).

Color. Las mediciones de color de las muestras de jugo filtrado de ambas fases del estudio, fueron realizadas en el LAAZ mediante Hunter L a b Colorflex. Los datos reportados fueron de L, a, b. Donde L indica claridad con valores en un rango de 0 (negro) – 100 (blanco perfecto). Para los valores de a el valor negativo corresponde al color verde y cuando es positivo se refiere al color rojo dentro de un rango de -60 a 60. Para el valor b cuando la medición proporciona un dato negativo el color es azul y cuando el valor es positivo corresponde al color amarillo, de igual manera con valores en un rango de -60 a 60.

Turbidez. Las mediciones de turbidez de las muestras de jugo de tamarindo de ambas fases del estudio se realizaron en el LAAZ por medio del porcentaje de transmitancia en el espectrofotómetro Spectronic 20 a una longitud de onda de 650 nm con agua destilada como blanco (Mack 2011). Los resultados fueron reportados en valores de absorbancia.

Coliformes fecales. Previo al análisis sensorial de la primera fase del estudio, se realizó el método del número más probable (NMP) para determinar la presencia de coliformes fecales que pudieron haber contaminado el agua que se utilizó en la preparación del jugo (FDA 2012) en el LMAZ. Debido a que los jugos presentan sustratos ideales para la colonización de diversos microorganismos, era importante controlar la materia prima hasta el producto final. Según el Reglamento Técnico Centroamericano (2009), para bebidas envasadas no carbonatadas, no pasteurizadas se presenta un límite máximo permitido de *Escherichia coli* <3 NMP/ mL de muestra. Se emplearon tres diluciones que permitieron tener un estimado sobre un rango de posibles conteos microbianos. Las diluciones fueron: 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} por tubos triplicados con agua peptonada estéril con sus respectivas campanas. Las muestras fueron incubadas durante 48 horas a 45 °C y se contabilizó el número de tubos con presencia de burbujas o turbidez.

Prueba sensorial exploratoria de aceptación. Se realizó una prueba exploratoria de aceptación en el Laboratorio de Evaluación Sensorial de Zamorano, mediante tres sesiones con 30 panelistas no entrenados en cada una. La evaluación fue realizada por medio de una escala hedónica de nueve puntos donde “1” representaba “me desagradó extremadamente” y “9” estuvo asignado a “me agrada extremadamente”. Se evaluaron los atributos sensoriales: color, olor, viscosidad, acidez, sabor y aceptación general. Se tomaron los cuatro mejores tratamientos resultantes con respecto a los resultados de análisis físico-químicos de la primera fase del estudio (Cuadro 3). Es decir, dos tratamientos de la dilución más concentrada (control y el mejor con tratamiento enzimático - 3 horas de incubación) y lo mismo para la dilución menos concentrada. Al elaborar el jugo, se agregó azúcar (0.03 g/mL) a todos los tratamientos. Después de pruebas preliminares se decidió no incrementar más sólidos solubles (°Brix) debido a que lo que se deseaba evaluar era el sabor del tamarindo en sí, más no la dulzura del jugo. Se observó que al llegar a 9 °Brix el sabor del tamarindo pasó desapercibido ya que el sabor del azúcar fue más pronunciado. Además, al jugo ofrecido a los panelistas no fue necesario agregarle agua para diluirlo más después de lo que resultó de la filtración.

Cuadro 3. Diseño experimental para análisis sensorial primera fase.

Dilución (Agua:Pulpa)	Incubaciones (horas)	
	0 ¹	3
13:1	T ² 1	T 2
21:1	T 3	T 4

¹Tratamiento sin enzima ni incubación. ²Tratamiento.

Análisis de costos variables. Se utilizaron los tratamientos de la segunda fase del estudio para el análisis de costos variables. Es decir, los tratamientos controles (sin enzimas) de ambas diluciones contra los dos mejores tratamientos de mayor extracción de polifenoles solubles y mejor rendimiento de la primera fase del estudio.

Análisis estadístico y diseño experimental. Se emplearon bloques completamente al azar (BCA) con arreglo factorial de 2×4 con tres repeticiones para la primera fase del estudio. Donde los factores evaluados fueron las dos proporciones de Agua:Pulpa (13:1 y 21:1) con los cuatro distintos tiempos de incubación (0 – control sin enzima, 2, 2.5 y 3 horas). De tal manera que se contó con ocho tratamientos y tres repeticiones para un total de 24 unidades experimentales. De la misma manera se empleó BCA para los tratamientos de la segunda fase del estudio, con arreglo factorial de 2×2 con sus tres repeticiones. Es decir, dos tratamientos de la proporción 3:1 Agua:Pulpa (control y 3 horas de incubación) y dos tratamientos de la proporción 7:1 (control y 3 horas de incubación) para un total de 12 unidades experimentales. Los datos fueron analizados mediante análisis de varianza (ANDEVA) con el programa estadístico “Statistical Analysis System” (SAS® v. 9.3) con separación de medias ajustadas Tukey ($p < 0.05$) para determinar las diferencias significativas entre los tratamientos del estudio.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

pH. Durante la primera fase se observaron diferencias significativas entre los tratamientos de la dilución más concentrada contra los tratamientos de la dilución menos concentrada (Cuadro 4). Los tratamientos que contenían menor cantidad de pulpa en la dilución, fueron los que presentaron valores de pH mayores comparados con los valores de pH de los tratamientos de la dilución que contenía más pulpa. Esto sugiere que la enzima penetró las paredes celulares de la pectina rompiéndolas y extrayendo la mayor cantidad de componentes que en ella se encontraban, en este caso los ácidos orgánicos causaron disminución en sus valores de pH (León y Rosero 2009). Sin embargo, a pesar de las distintas diluciones, todos los tratamientos se mantuvieron en el mismo rango, ya que sólo hubo una disminución máxima de 1.97% en los valores de pH donde el máximo fue 3.05 y el mínimo 2.99. Mediante pruebas de laboratorio, al homogenizar pulpa de tamarindo con agua el pH oscila entre 2 y 4. Este efecto causó una ligera diferencia entre los tratamientos más diluidos contra los menos diluidos, además de que el factor dilución fue determinante para encontrar diferencias entre los tratamientos ($P < 0.05$). Este comportamiento concuerda con estudios realizados a la pulpa de tamarindo donde las características físico-químicas del mismo como pH, °Brix, acidez, entre otras, no se vieron afectadas al aplicarse un tratamiento enzimático para la extracción de jugo (Gorocica y Rivera 2011).

Sólidos solubles totales. En cuanto a los sólidos solubles presentes en los jugos de tamarindo de la primera fase, se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (Cuadro 4). Se observó que la dilución fue un factor importante en la cuantificación de sólidos solubles ya que en la dilución con menos cantidad de pulpa hubo entre 25 a 45% menos de éstos compuestos comparados con los cuantificados en la dilución más concentrada. Adicionalmente, los valores de los tratamientos de la dilución más concentrada sólo variaron 7.5% entre ellos, mientras que entre los valores de la dilución menos concentrada variaron un 26.5% entre ellos. Los tratamientos de la dilución más concentrada contaron con mayores valores de °Brix comparados contra los tratamientos de menor concentración. Esto fue debido a que hubo mayor migración de sólidos al agua gracias a la presencia de mayor cantidad de pulpa inicial de la cual se pudieron extraer más componentes. Das *et al.* (1994) comentó que las pectinasas solubilizan la pectina lo cual causa el aumento de sólidos solubles además de que también las paredes de las células que contienen jugo se ablandan así como el tejido de la pulpa y aumenta la extracción de jugo. Esto fue atribuido a la cantidad de pulpa inicial que se colocó en la dilución, lo cual aumentó el conteo final de sólidos solubles, en cada dilución los mejores tratamientos fueron los de tratamiento enzimático a 3 horas de incubación (tratamiento 4 y tratamiento 8).

Cuadro 4. Efecto de tratamientos enzimáticos en análisis físico-químicos de jugo de tamarindo primera fase.

T ¹	Dilución (Agua:Pulpa)	Tiempo de incubación (horas)	pH	Sólidos Solubles (% °Brix)	Turbidez (abs)	Viscosidad (Pa·s)	Fenoles Totales (mg/L EAG ²)
			Media ± D.E. ³	Media ± D.E.	Media ± D.E.	Media ± D.E.	Media ± D.E.
1	13:1	0.0 ⁴	3.00 ± 0.02 ^{BC 5}	2.67 ± 0.12 ^A	0.05 ± 0.003 ^D	0.00488 ± 0.21 ^A	3550 ± 43.0 ^C
2		2.0	3.00 ± 0.05 ^{BC}	2.47 ± 0.15 ^B	0.05 ± 0.002 ^C	0.00493 ± 0.28 ^A	3740 ± 80.1 ^B
3		2.5	3.00 ± 0.02 ^{BC}	2.47 ± 0.15 ^B	0.06 ± 0.005 ^B	0.00506 ± 0.08 ^A	3700 ± 95.5 ^B
4		3.0	2.99 ± 0.02 ^C	2.67 ± 0.15 ^A	0.08 ± 0.002 ^A	0.00499 ± 0.18 ^A	4060 ± 113 ^A
5	21:1	0.0	3.03 ± 0.03 ^{AB}	1.70 ± 0.10 ^D	0.04 ± 0.004 ^D	0.00495 ± 0.22 ^A	2210 ± 42.9 ^F
6		2.0	3.05 ± 0.04 ^A	1.47 ± 0.06 ^E	0.05 ± 0.002 ^{CD}	0.00504 ± 0.21 ^A	2760 ± 69.6 ^D
7		2.5	3.02 ± 0.05 ^{AB}	1.73 ± 0.15 ^D	0.06 ± 0.005 ^B	0.00500 ± 0.15 ^A	2650 ± 70.6 ^E
8		3.0	3.02 ± 0.03 ^{ABC}	2.00 ± 0.10 ^C	0.08 ± 0.003 ^A	0.00497 ± 0.23 ^A	2840 ± 18.4 ^D
CV ⁶ (%)			0.68	5.20	5.01	2.33	2.79

¹Tratamiento. ²Equivalentes en ácido gálico. ³Desviación estándar. ⁴Tratamiento sin enzima ni incubación. ⁵Medias con letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas (P<0.05). ⁶Coeficiente de variación.

El comportamiento de los sólidos solubles se asemeja a otros estudios donde a puré y jugo de tamarindo se les aplicó tratamiento enzimático y presentaron mayores cantidades de sólidos solubles debido a que la enzima rompió la pectina y la dejó en suspensión mediante el proceso de extracción (Gómez 2004). La cantidad de sólidos solubles dependió de la dilución y del tiempo de incubación ($P < 0.01$). Al no encontrarse que diferencias significativas entre los tratamientos controles y de mayor tiempo de incubación en ambas diluciones fue necesario abocarse a otro tipo de análisis para determinar el mejor tratamiento.

Turbidez. Los valores de turbidez permitieron tener un reflejo del grado de transparencia que presenta el agua por las partículas en suspensión (Cuadro 4). Se encontraron diferencias significativas entre diluciones y también entre tratamientos. Se observó en ambas diluciones un comportamiento similar donde a mayor tiempo de incubación mayor valor de absorbancia. En ambas diluciones se encontraron incremento en los valores de absorbancia a mayor tiempo de incubación, 38% dilución más concentrada y 50% dilución menos concentrada. La turbidez puede ser usada para proporcionar una estimación de la concentración de sólidos totales en suspensión (Lenntech 2011). El factor tiempo de incubación fue el que causó diferencias entre los tratamientos ($P < 0.01$). Fue clave en el análisis de turbidez debido a que a menor concentración inicial de pulpa, menores valores de absorbancia relacionando con menor cantidad de sólidos en el jugo.

Viscosidad. Con respecto a los valores de viscosidad de los distintos tratamientos de la primera fase del estudio (Cuadro 4), no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ni entre diluciones. Pero sí se observaron diferencias numéricas donde los valores de viscosidad reportados, variaron máximo 3.6% entre ellos pero no causaron diferencias significativas. Se determinó el comportamiento de un fluido newtoniano ya que se observó que la viscosidad permaneció constante para cualquier velocidad de deformación aplicada lo cual es una característica principal de éste tipo de fluido (González 2009). Es decir, la enzima aplicada rompió los enlaces entre los polisacáridos que componen la pectina reduciendo la viscosidad. La filtración también jugó un papel muy importante ya que incluso los tratamientos controles (sin enzima) presentaron viscosidad similar a los tratamientos a los que se les aplicó enzima. En casos como puré de manzana, Carvajal (2007) observó con enzimas aplicadas que una mezcla de enzimas de 200 ppm Pectinex[®] 3X L con 400 ppm Pectinex[®] SP-L fue el mejor tratamiento ya que disminuyó la viscosidad inicial en un 95.2% después del tratamiento enzimático a 40 °C por 90 minutos; ya que éstas, degradaron pectinas, celulosas y hemicelulosas que conforman las paredes celulares. La viscosidad se ve íntimamente relacionada a la pectina en el medio ácido (Víctor 2006) y al haber filtrado y retirado la pulpa se eliminó casi en su totalidad los solutos que podían haberse quedado flotando en el solvente causando un incremento en la viscosidad del jugo de tamarindo.

Polifenoles solubles totales. El conteo de polifenoles solubles de los tratamientos de la primera fase incrementó notoriamente a medida que se aumentó el tiempo de incubación de la enzima (Cuadro 4), el patrón fue el mismo independientemente del tipo de dilución

que se empleó. A mayor tiempo de incubación mayor extracción de polifenoles de la pulpa de tamarindo observándose la mayor cuantificación para los tratamientos incubados mayor tiempo (3 horas), en ambas diluciones. Mack (2011) obtuvo en su estudio que a menos de 2 horas de incubación no se encontraron diferencias significativas contra el control al aplicar la enzima pectinasa a muestras diluidas de puré de guayaba. Los demás análisis físico-químicos ayudaron a analizar factores que favorables en las características sensoriales del jugo. El conteo de los polifenoles solubles dentro de una solución fue el que ayudó a determinar el correcto funcionamiento de la enzima en el jugo de tamarindo. Una ligera variación en la lectura de los mismos, generó un cambio notorio en la proporción de los polifenoles totales extraídos.

La acción de la enzima en la dilución más concentrada a mayor tiempo de incubación permitió extraer 23% más de polifenoles solubles totales que el control, mientras que en con la dilución menos concentrada aumentó 29%. Al momento de comparar entre los mejores tratamientos de cada dilución, el tratamiento 4 de la dilución más concentrada presentó 30% más de polifenoles que el mejor tratamiento de la dilución menos concentrada (tratamiento 8). El factor dilución, tiempo de incubación y la interacción de los mismos fueron significativamente clave en la cuantificación ($P < 0.01$). El tratamiento 4 resultó ser el de mayor conteo de polifenoles (mayor tiempo de incubación en la dilución más concentrada) ya que a mayor presencia de pulpa existió mayor posibilidad de extraer los polifenoles solubles totales por medio de la enzima. Pero como se mencionó anteriormente el patrón fue el mismo en los tratamientos incubados de ambas diluciones ya que la enzima logró romper la pared celular y extraer mayor cantidad de compuestos que se encontraban atrapados en ella. En ciertos análisis no fue posible observar diferencias significativas entre tratamientos debido a la acción de la enzima ya que los componentes se encuentran en pequeñas cantidades, como en pH, viscosidad y °Brix. Mientras que en el caso de polifenoles totales una ligera variación en la cuantificación de los mismos, generó un incremento en el conteo final. A pesar de que éstos compuestos se encontraron en mínimas cantidades junto con otros ácidos orgánicos, fueron los encargados de generar un perfil de sabor, color, olor característico de un jugo normal con pulpa.

Uno de los factores más importantes en el estudio fue la extracción de los polifenoles atrapados en la pared celular de la pulpa de tamarindo mediante la enzima pectinasa ya que éstos compuestos son benéficos para la salud (Anusic 2011). Los polifenoles no son considerados “nutrientes” ya que no se les ha determinado una función conocida en la nutrición pero tienen propiedades antioxidantes, anticarcinogénicas y antiinflamatorias. Probablemente no son absorbidos a nivel de la luz intestinal, se concentran a nivel del íleon o del intestino grueso donde pueden ejercer interacciones beneficiosas con las células de la mucosa del intestino distal (Casares 2010). Considerando que, los polifenoles son importantes en la reducción de la incidencia de arteriosclerosis, promoción de tumores, carcinogénesis conocidas como enfermedades crónicas (Universidad de Barcelona 2011). Los fenoles en las plantas son estructuras más complejas (ligninas) que se encuentran reforzando la pared celular, los flavonoides e isoflavonoides en la mayoría de las plantas principalmente se encuentran unidos a azúcares (Anusic 2011).

Los polifenoles actúan como antioxidantes atrapando los radicales libres que se encuentran en el cuerpo humano donde el ácido gálico funciona como patrón para la cuantificación de los mismos (Muñoz *et al.* 2007). Los polifenoles son subdivididos en taninos hidrolizables, que son polímeros heterogéneos hidrolizados con más facilidad, formados por ácidos fenólicos (ésteres de ácido gálico), glucosa y otros azúcares (Rodríguez *et al.* 2011). Es por esto que al haber hidrolizado la pulpa de tamarindo con agua purificada se logró extraer mayor cantidad de polifenoles sin necesidad de aplicar alcoholes o sustancias químicas más fuertes. El método usado en el estudio mediante el reactivo Folin Ciocalteu, permitió que el mismo reaccionara con los compuestos fenólicos para luego ser cuantificados mediante espectrofotometría y curvas de ácido gálico (Sigma 2012). La cuantificación resultante en el análisis permitió observar que la enzima funcionó eficientemente extrayendo los polifenoles presentes en la pulpa de tamarindo. Sin embargo, investigaciones han demostrado que existe una fracción de polifenoles no extraíbles en las frutas que no son cuantificadas, superando la cuantificación de la fracción extraíble hasta en cinco veces (Arranz *et al.* 2009).

Color. Con respecto a los resultados de color de los tratamientos de la primera fase del estudio (Cuadro 5), se observó que de acuerdo con la variable L (luminosidad) existieron diferencias significativas entre los tratamientos. Se observó que los tratamientos controles en ambas diluciones fueron los que tendían a luminosidad cercana a la del agua (67.6 ± 0.07) por encontrarse con menor extracción de compuestos disueltos en el medio. Además se observó que a mayor tiempo de incubación menor valor L es decir menos luminoso y más opaco. Esto puede atribuirse a la cantidad de sólidos extraídos mediante la acción enzimática. Los valores L de ambas diluciones disminuyeron 7.4% promedio entre los tratamientos controles y de mayor tiempo de incubación. La variable b también fue importante ya que su escala se encuentra entre azul y amarillo. Se observó que a mayor tiempo de incubación mayor valor b es decir colores más amarillos. El tratamiento con mayor tiempo de incubación fue 43% más amarillo que el control en la dilución más concentrada. Mientras que para la dilución menos concentrada, el tratamiento de mayor tiempo de incubación resultó 14% más amarillo que el tratamiento control. Esto se atribuyó a la mayor concentración de colores extraídos mediante la acción enzimática. La aplicación de enzimas pectinasas permite la extracción de compuestos que son los encargados de otorgar colores al jugo de tamarindo (taninos) atrapados en la pared celular de la pulpa (Universidad de Barcelona 2011). En general se observó que a mayor concentración inicial de pulpa y mayor tiempo de incubación más intenso fue el color en el jugo. Donde, el factor dilución para la variable L y b fue determinante en el estudio ($P < 0.01$) como también para la variable. Según Cardona (2005), en su estudio realizado con pectinasas y celulasas en açai (*Euterpe oleracea* Mart.), el tratamiento mezclando dos tipos de enzimas en una cantidad de 50 U/mL logró extraer el jugo sin dañar el color del mismo. En el presente estudio, la acción y presencia de la enzima no causó efectos desfavorables sino que atribuyó características apropiadas para el jugo filtrado.

Cuadro 5. Efecto de tratamientos enzimáticos en análisis de color en jugo de tamarindo primera fase.

T ¹	Dilución (Agua:Pulpa)	Tiempo de incubación (horas)	Color		
			L	a	b
			Media ± D.E. ²	Media ± D.E.	Media ± D.E.
1	13:1	0.0 ³	60.6 ± 0.08 ^{D 4}	-1.47 ± 0.07 ^C	10.8 ± 0.08 ^G
2		59.2 ± 0.14 ^F	0.30 ± 0.13 ^B	16.7 ± 0.16 ^C	
3		59.1 ± 0.07 ^F	-0.54 ± 0.15 ^D	18.5 ± 0.12 ^B	
4		56.2 ± 0.11 ^G	0.63 ± 0.12 ^A	18.8 ± 0.11 ^A	
5	21:1	0.0	64.7 ± 0.07 ^A	-0.76 ± 0.09 ^F	13.0 ± 0.11 ^F
6		62.1 ± 0.05 ^B	-0.69 ± 0.04 ^E	13.3 ± 0.11 ^F	
7		62.0 ± 0.07 ^C	-0.76 ± 0.09 ^E	14.6 ± 0.04 ^E	
8		59.8 ± 0.06 ^E	-0.45 ± 0.06 ^D	15.1 ± 0.07 ^D	
CV ⁵ (%)			0.11	0.11	0.47

¹Tratamiento. ²Desviación estándar. ³Tratamiento sin enzima ni incubación. ⁴Medias con letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas (P<0.05). ⁵Coeficiente de variación.

Coliformes fecales. De acuerdo con el conteo de coliformes fecales a las muestras de los tratamientos que fueron llevados a pruebas sensoriales de aceptación, se observó que no existió presencia de los mismos. No se encontró presencia de turbidez ni gas en los tubos de las distintas diluciones reportándose como <3 NMP/ mL de muestra (Cuadro 6), es decir que el jugo de tamarindo estuvo en óptimas condiciones para el consumo humano. El método de NMP asume que las bacterias están distribuidas en la muestra, las cuales pueden producir un crecimiento detectable (FDA 2012). Según publicaciones revisadas, Ramis (1996), indica que las aguas superficiales son las principalmente afectadas debido a la contaminación microbiana donde las bacterias patógenas se propagan. Además, cada vez es más difícil disponer de agua con las características favorables para consumo por la contaminación de la misma ya que ciertos microorganismos que al eliminarse por las heces y orina de enfermos portadores tienen la mayor probabilidad de contaminarla (Ávila y Fonseca 2008).

Cuadro 6. Coliformes fecales (NMP) en jugo de tamarindo para análisis sensorial.

T ¹	Dilución (Agua:Pulpa)	Incubación (horas)	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³
1	13:1	0 ²	0	0	0
2		3	0	0	0
3	21:1	0	0	0	0
4		3	0	0	0
REPORTE	<3 NMP ³ /mL				
LÍMITE DE CONFIRMACIÓN		BAJO: indeterminado		ALTO: 9.5	

¹Tratamiento. ²Control: sin inoculación de enzima. ³Número más probable permitido.

Rendimiento del jugo. Se observaron incrementos en los rendimientos de los tratamientos analizados en la prueba sensorial ya que el aplicar el tratamiento enzimático antes de la filtración permitió obtener mejores resultados (Figura 1). Las enzimas no sólo solubilizaron la pared celular para extraer más sólidos solubles sino que también aumentaron la extracción de jugo que se encontraba atrapado en la pectina. León y Rosero (2009), señalan que ciertas mezclas de enzimas generan incrementos en rendimientos del 5 al 15% comparados con los que no cuentan con ningún tipo de enzima. Con respecto a la dilución más concentrada se observó que mediante proceso enzimático se logró obtener 4.9% más de extracción de jugo. Mientras que para la dilución menos concentrada se logró obtener 5.2% más de extracción. En general se observa el mismo comportamiento ya que los tratamientos inoculados con enzima e incubados fueron los que presentaron mejores rendimientos. El tratamiento 4 fue el de mejor rendimiento pero no el de mejores características sensoriales ni físico-químicas comparado con el tratamiento 2 que inicialmente contó con mayor cantidad de pulpa de la cual se extrajeron más componentes que otorgaron mejores características en el jugo. Con respecto a los factores dilución y tiempo de incubación si causaron diferencias significativas entre los tratamientos es decir fueron factores importantes en el cálculo de rendimiento ($P<0.01$).

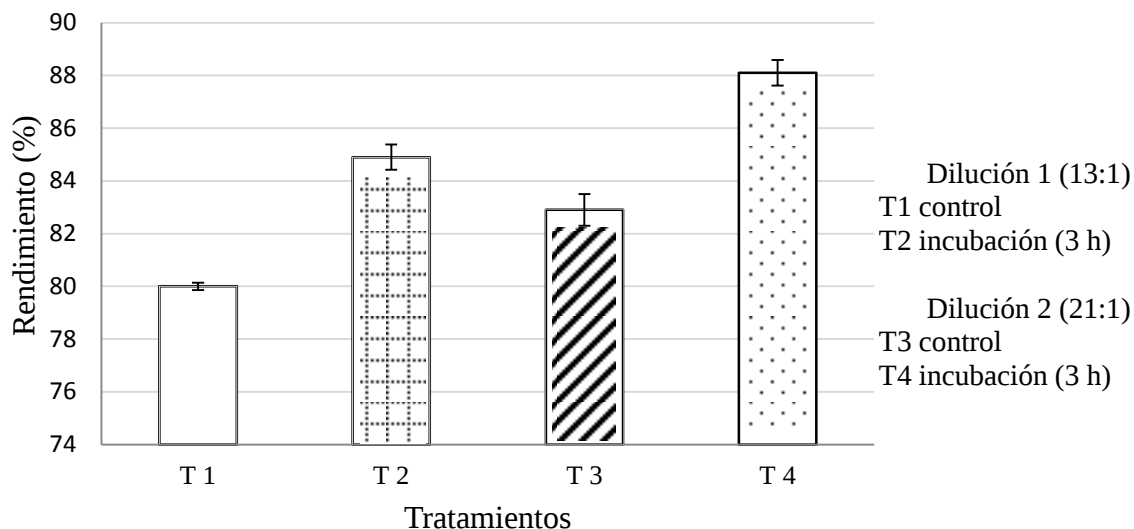


Figura 1. Rendimiento de los tratamientos evaluados en la prueba sensorial primera fase.

Prueba sensorial exploratoria de aceptación. Mediante pruebas preliminares se determinó que el jugo de tamarindo de los tratamientos de la primera fase que fueron escogidos para ser sometidos a pruebas sensoriales con °Brix tan bajos podía causar una percepción distinta de lo que se quería evaluar. Por lo cual, fue necesario explicar a los panelistas que la intención no era evaluar la dulzura del jugo sino el sabor del tamarindo y de tal manera evitar sesgo en los panelistas no entrenados. Para la variable color (Cuadro 7), los panelistas asignaron valores más altos a los tratamientos de mayor concentración y mediante análisis estadístico se observó que hubieron diferencias significativas en los valores que los panelistas asignaron a cada tratamiento.

También, para la variable olor se encontraron diferencias significativas, donde los panelistas asignaron valores menores al tratamiento 4 (con enzima y 3 horas de incubación) de la dilución menos concentrada como el tratamiento de olor distinto comparado con los otros tres tratamientos evaluados. Sin embargo, esto puede ser atribuido a que el tratamiento 4 se encontraba mayormente diluido comparado con los tratamientos de la dilución más concentrada. Por otro lado, para la variable viscosidad se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, resultando los tratamientos de mayor tiempo de incubación de ambas diluciones, con valores mayores asignados por los panelistas de esos dos tratamientos comparados con los controles (sin incubación). Esta percepción pudo ser un poco variada debido a que los panelistas asociaron viscosidad con la variable color. A medida que el jugo fue incubado como se ha mencionado anteriormente, fue posible extraer mayor cantidad de compuestos que generan olores y colores lo cual los panelistas pudieron haber asociado como mayormente viscoso. Sin embargo, mediante análisis físico-químicos se determinó que no existieron diferencias significativas entre los tratamientos. Con respecto a la acidez de las muestras evaluadas, se encontraron diferencias significativas entre cada dilución, donde los panelistas asignaron mayores valores a las muestras de los tratamientos de la dilución más concentrada debido a que contenían mayor cantidad de pulpa de la cual que se extrajo

Cuadro 7. Resultados de prueba sensorial exploratoria y rendimiento de jugo de tamarindo primera fase.

T ¹	Dilución (Agua:Pulpa)	Tiempo de incubación (horas)	Color	Olor	Viscosidad	Acidez	Sabor	Aceptación General
			Media ± D.E. ²	Media ± D.E.	Media ± D.E.	Media ± D.E.	Media ± D.E.	Media ± D.E.
1	13:1	0.0 ³	5.91 ± 1.50 ^{B 4}	5.84 ± 1.42 ^A	5.94 ± 1.46 ^{AB}	5.96 ± 1.59 ^{AB}	6.14 ± 1.58 ^A	6.28 ± 1.44 ^{AB}
2		3.0	6.73 ± 1.60 ^A	5.67 ± 1.53 ^A	6.11 ± 1.49 ^A	6.15 ± 1.64 ^A	6.14 ± 1.75 ^A	6.78 ± 1.51 ^A
3	21:1	0.0	4.83 ± 1.79 ^D	5.57 ± 1.73 ^{AB}	5.79 ± 1.78 ^{AB}	5.74 ± 1.71 ^B	5.39 ± 2.08 ^B	5.70 ± 1.81 ^{BC}
4		3.0	5.08 ± 1.71 ^C	5.11 ± 1.69 ^B	5.51 ± 1.66 ^B	5.61 ± 1.71 ^B	5.24 ± 1.88 ^B	5.47 ± 1.75 ^C
CV ⁵ (%)			29.44	28.88	27.44	28.22	31.92	34.07

¹Tratamiento. ²Desviación estándar. ³Tratamiento sin enzima ni incubación. ⁴Medias con letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas (P<0.05). ⁵Coefficiente de variación.

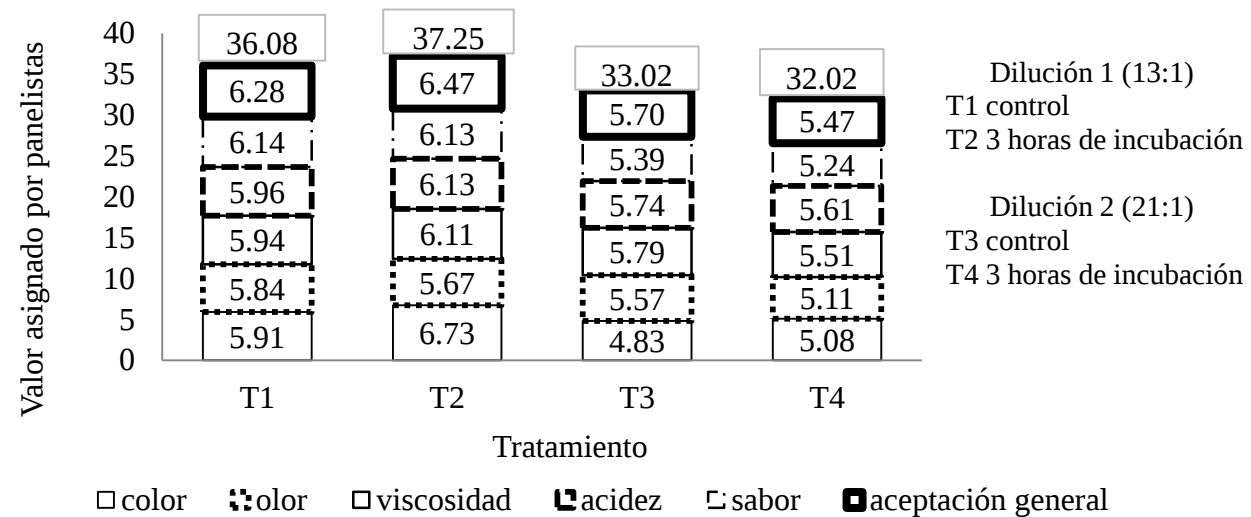


Figura 2. Sumatoria resultados prueba sensorial de aceptación primera fase.

mayor cantidad de ácidos. También, para la variable sabor de las muestras evaluadas se encontraron diferencias significativas, donde los panelistas prefirieron las muestras de los tratamientos de mayor concentración de pulpa. Es decir que a mayor concentración de pulpa inicial se extrajeron mayor cantidad de sabores agradables para los panelistas. Mientras que para la variable aceptación general también se encontraron diferencias significativas, se observó que el tratamiento inoculado con enzima de la dilución más concentrada fue el mejor evaluado con un valor de “6 – me gusta poco” en la escala hedónica. Mientras que el tratamiento inoculado con la enzima pero de la dilución menos concentrada fue el evaluado con menores valores por los panelistas. Todos estos factores se vieron afectados debido a las muestras muy diluidas. En general se observó que la variable dilución fue la que causó diferencias significativas entre los tratamientos analizados por los panelistas ($P < 0.05$).

De acuerdo con la sumatoria de los valores que los panelistas asignaron en cada factor evaluado el tratamiento de la dilución más concentrada y con enzima fue el tratamiento preferido por los panelistas (Figura 2). Esto se atribuyó a que fue el tratamiento con mayor concentración de pulpa inicial de la cual fue posible extraer mayor cantidad de compuestos atrapados en la pulpa como se ha venido discutiendo anteriormente. Los cuales le dieron al jugo mejores características sensoriales haciéndolo preferido para los panelistas. En general los tratamientos de la dilución más concentrada fueron los mejores evaluados por los panelistas ya que les asignaron mejores puntuaciones a los mismos.

Segunda fase. La segunda fase del estudio se realizó debido a los resultados obtenidos en la primera fase y más específicamente en la prueba sensorial de aceptación ya que se obtuvieron comentarios y sugerencias en las boletas de que el jugo necesitaba mayor concentración. Para lo cual, se tomaron los mismos tratamientos utilizados en la prueba sensorial de aceptación (un control sin inoculación de enzima y 3 horas de incubación con inoculación de enzima) con la diferencia de que se utilizó una mayor relación de Agua:Pulpa. Como dilución 1 se tomó una relación 3:1 (Agua:Pulpa) y como dilución 2 se empleó 7:1 (Agua:Pulpa). Las cuales manteniendo el proceso de incubación y filtración igual que en la primera fase fueron sometidas a los mismos análisis físico-químicos. Las muestras fueron incubadas en una proporción de 1:1 (Agua:Pulpa) y los controles (sin incubación) también en la misma proporción para su primer filtrado.

Rendimiento. Después de la incubación y filtración de cada tratamiento, el jugo filtrado fue medido volumétricamente. Se encontraron diferencias significativas entre diluciones y entre cada tratamiento (Cuadro 8). Fue necesario considerar la densidad de la pulpa de tamarindo (1.19 g/ mL) para cuantificar la cantidad de agua que la pulpa aporta aparte del agua purificada que se agregó. Se observó que los tratamientos con mejores rendimientos fueron los inoculados con enzimas en cada dilución pero el tratamiento 4 fue el de mayor rendimiento (dilución 2 con 3 horas de incubación). Aunque el tratamiento 2 (dilución 1 con 3 horas de incubación) fue el mejor en la dilución más concentrada y no se encontraron diferencias significativas entre éstos. En la dilución más concentrada se logró obtener un incremento del 10% en rendimiento. Mientras que en la dilución menos concentrada se obtuvo un incremento de 9% entre tratamientos. La enzima se encargó de

romper la pectina y liberar los compuestos que se encontraban atrapados en la misma. Al no encontrarse diferencias significativas entre los tratamientos con enzima de ambas diluciones fue necesario abocarse a los análisis físico-químicos para determinar el mejor tratamiento. Considerando que el tratamiento 2 contenía mayor proporción inicial de pulpa de la cual se pudo extraer mayor cantidad de agua y compuestos. Como fue en el caso de la filtración que el tratamiento 2 inició con 768 mL de pulpa + agua purificada de la cual se obtuvo 684 mL de jugo clarificado (89%). Mientras que del tratamiento 4 se contó inicialmente con 673 mL y se obtuvo 605 mL (90%). Las variables que afectaron entre los tratamientos fueron la dilución y el tiempo de incubación.

pH. De acuerdo con los valores de pH de las muestras analizadas se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (Cuadro 8). En general, los tratamientos de la dilución 1 presentaron valores de pH menores (más ácidos) comparados con los de los tratamientos de la dilución 2. Esto fue debido a que los tratamientos de la dilución 1 contenían mayor cantidad de pulpa de tamarindo, de la cual fue posible extraer mayor cantidad de ácidos atrapados en la pared celular. Por otro lado, se observó que el tratamiento con inoculación de enzima en cada una de las diluciones, presentó valores de pH mayores a los controles en ambos casos. Éste fue un comportamiento totalmente opuesto al observado en la primera fase del estudio, el cual fue atribuido a que en el tratamiento con inoculación de la enzima se obtuvo mayor cantidad de jugo (mayor rendimiento). Se atribuyó ese comportamiento al valor de pH del agua purificada utilizada (7.74) ocasionando que el jugo en general fuera menos ácido al encontrarse mayormente diluido.

A pesar de que la variación fue mínima en cada dilución, causó diferencias significativas. El inoculado con enzima con respecto al control de la dilución 1 presentó un incremento de 2.88% en valores de pH. Mientras que en la dilución 2, el tratamiento con enzima presentó un incremento de 2.07% comparado con el control. Es decir el comportamiento fue el mismo independientemente de las diluciones ya que en ambos casos los tratamientos con incubación fueron los de mejores rendimientos. Sin embargo, el tratamiento 2 presentó valores de pH más bajos en un 4.5% contra el tratamiento 4 es decir fue más ácido debido a la cantidad de pulpa inicial y a los componentes que se lograron extraer de la misma. Las variables que más afectaron en la evaluación del pH de las muestras fueron dilución y tiempo de incubación ($P < 0.01$).

Sólidos solubles. Los resultados de las mediciones a cada tratamiento de sólidos solubles determinaron que existieron diferencias significativas entre los tratamientos (Cuadro 8). Se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos de la dilución 1 mientras que no se encontraron diferencias significativas para los tratamientos de la dilución 2. Hubo una disminución del 6.55% de sólidos solubles en el tratamiento con enzima comparado con el control que causó diferencias significativas. Nuevamente, como en el caso de los valores de pH, se encontró que a mayor extracción de jugo a partir de la pulpa (mayor rendimiento) menor cantidad de sólidos solubles. Debido a que los compuestos extraídos mediante el proceso enzimático se encontraban en un medio más diluido ya que aumentó también la cantidad de agua extraída. El tratamiento con enzima en la dilución

Cuadro 8. Efecto de tratamientos enzimáticos en análisis físico-químicos de jugo de tamarindo segunda fase.

T ¹	Dilución (Agua:Pulpa)	Tiempo de incubación (horas)	Rendimiento (%) Media ± D.E. ² .	pH Media ± D.E.	Sólidos Solubles (% °Brix) Media ± D.E.	Turbidez (abs) Media ± D.E.	Viscosidad (Pa·s) Media ± D.E.
1	3:1	0 ³	78.7 ± 0.67 ^{C 4}	2.69 ± 0.02 ^D	8.70 ± 0.20 ^A	0.13 ± 0.01 ^B	0.00487 ± 0.02 ^{AB}
2		3	88.8 ± 0.69 ^A	2.77 ± 0.01 ^C	8.13 ± 0.23 ^B	0.15 ± 0.01 ^A	0.00489 ± 0.13 ^A
3	7:1	0	81.0 ± 0.74 ^B	2.84 ± 0.01 ^B	4.18 ± 0.10 ^C	0.07 ± 0.01 ^C	0.00474 ± 0.04 ^{BC}
4		3	89.8 ± 0.54 ^A	2.90 ± 0.02 ^A	3.87 ± 0.06 ^C	0.11 ± 0.02 ^B	0.00469 ± 0.02 ^C
CV ⁵ (%)			0.85	3.63	2.95	10.87	1.41

¹Tratamiento. ²Desviación estándar. ³Tratamiento sin enzima ni incubación. ⁴Medias con letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas (P<0.05). ⁵Coefficiente de variación.

obtuvo 52% más de sólidos solubles contra el tratamiento con enzima en la dilución 2, debido a la cantidad de pulpa inicial empleada. Por otro lado, los factores que causaron diferencias significativas entre los tratamientos fueron tanto la dilución como el tiempo de incubación ($P < 0.01$).

Turbidez. Las medidas de turbidez permitieron determinar la presencia de ciertos componentes de alto peso molecular disueltos en el agua (Cuadro 8). Se encontraron diferencias significativas entre diluciones y entre tratamientos. En la dilución 1 se determinó que el tratamiento enzimático resultó en un incremento de 13% en valor turbidez. En la dilución 2 este efecto fue similar con un incremento 36% en valor de turbidez. En general se observó el mismo comportamiento donde el tratamiento con inoculación de la enzima en ambas diluciones obtuvo valores mayores de absorbancia. Esto fue atribuido a que la turbidez es una medida que refleja el grado de transparencia que presenta el agua debido a la presencia de partículas en suspensión. Puede ser usada para proporcionar una estimación de la concentración de Sólidos Totales en Suspensión (Lenntech 2011). Es decir, se obtuvieron los resultados esperados de la acción de la enzima, lo cual demostró que la enzima extrajo mayor cantidad de componentes que se encontraban atrapados en la pared celular de la pectina. Fue posible extraer mayor cantidad de compuestos debido a que la enzima al encontrarse en un medio con mayor cantidad de pulpa rompe los enlaces de la cadena de polisacáridos haciéndolos más pequeños facilitándoles su paso por el filtro.

De acuerdo con los valores de absorbancia, se observó que tiene poca cantidad de sólidos solubles en suspensión ya que el promedio de absorbancia en el jugo estuvo entre 0.12. Un incremento del 12% contra el agua que tiene 0.000 absorbancia y muy distinto con la leche que presenta 3.79 de absorbancia. Los factores que influyeron en el análisis fueron dilución y tiempo de incubación ($P < 0.01$).

Viscosidad. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las diluciones principalmente más no entre los tratamientos de cada dilución independiente (Cuadro 8). Es decir, entre los tratamientos de la dilución más concentrada no se encontraron diferencias significativas donde sólo hubo disminución del 0.41% de viscosidad y tampoco entre los tratamientos de la dilución más diluida donde hubo 2.11% de disminución. Este comportamiento fue diferente comparado con el encontrado en la primera fase del estudio donde no se encontró ninguna diferencia significativa entre tratamientos ni diluciones. Estas variaciones pueden atribuirse a la temperatura a la cual se encontraba el jugo filtrado. A pesar de que mediante pruebas se obtuvo la viscosidad del agua ($0.00362 - 0.00488 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ en 125 y 250 rpm) y se observó que el jugo filtrado de tamarindo se comportaba de manera similar. Es por esto que se determinó que a pesar de haber diferencias estadísticas entre los tratamientos todavía se encuentra considerado como un fluido newtoniano. Donde a medida que se aumenta la cantidad de pulpa inicial para filtrarse podría encontrarse mayores diferencias estadísticas entre los tratamientos debido a compuestos que se extraen de la pulpa mediante la enzima. Se encontró que el factor dilución fue importante para encontrar diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0.01$).

Polifenoles solubles totales. Se encontraron diferencias significativas estadísticamente en la cuantificación de fenoles totales en las muestras de jugo de tamarindo filtrado (Cuadro 9). Se observó que cada tratamiento fue totalmente diferente independientemente de la dilución a la que se encontraba. Esto fue debido a que a mayor cantidad de pulpa presente, mayor extracción posible de fenoles totales a partir de la misma por medio de tratamientos enzimáticos. Se encontró que el tratamiento con enzima en la dilución concentrada resultó ser el mejor tratamiento al igual que en la primera fase del estudio con un aumento del 19.7% de polifenoles contra el tratamiento control. Y en el caso de la dilución 2, el tratamiento con enzima obtuvo 13.5% más de polifenoles contra el tratamiento control. Sin embargo, en cada dilución el mejor tratamiento siempre fue el que contenía enzima. Comparando el tratamiento 2 (más concentrado con enzima) contra el tratamiento 4 (menos concentrado con enzima) se obtuvo un conteo de 52.1% más de polifenoles en el tratamiento 2. Es decir que la pectinasa rompió la pared celular de la pectina logrando así extraer la mayor cantidad de componentes que se encontraban en ella. Componentes que en otros análisis pasaron desapercibidos pero no en el caso de la cuantificación de polifenoles totales. Los factores más importantes en la cuantificación fueron dilución, tiempo de incubación e incluso se encontró interacción entre ellos ($P < 0.01$).

Color. Con respecto a los resultados de color (Cuadro 9), se encontraron diferencias estadísticas en cada una de las variables L a b. De acuerdo con la variable L (luminosidad) el tratamiento con enzima en la dilución concentrada obtuvo 22% menos de luminosidad contra el tratamiento control. Esto puede atribuirse a que se encontraba mayormente concentrado ya que la enzima extrajo compuestos que otorgan colores oscuros al jugo. De igual manera en el caso de la dilución 2 donde el tratamiento incubado obtuvo 12% menos de luminosidad contra el control. Para la variable b se encontraron diferencias estadísticas sin embargo los valores numéricos varían sólo en 5% entre ellos. Los tratamientos incubados fueron los que presentaron valores de amarillo más fuertes que los tratamientos sin enzima. Para la segunda fase del estudio al haber agregado mayor cantidad de pulpa inicial, se lograron extraer más los componentes atrapados en la pulpa. Lo cual ocasionó que se obtuvieran colores más intensos y oscuros en el jugo de mayor concentración de pulpa inicial, muy diferentes a los obtenidos en la primera fase del estudio. Fue posible alcanzar una de las recomendaciones después del análisis sensorial que fue que se incrementara el color en el jugo. Se presentaron variaciones muy distintas a las encontradas en la primera fase del estudio, más que todo relacionadas a la cantidad de jugo que se logró extraer al final de todo el procedimiento. Es decir que el factor rendimiento es de vital importancia para la realización de los análisis físico-químicos.

Análisis de costos variables. Se realizó el análisis de costos para los tratamientos de la segunda fase del estudio (Cuadro 10), el mejor tratamiento resultante de la primera fase (3 horas de incubación) comparado contra el control (sin tratamiento enzimático) de cada dilución respectivamente. En general los tratamientos con enzima resultaron los más costosos obviamente debido al costo de la energía más no debido al costo de la enzima. De igual manera los tratamientos de mayor concentración de pulpa inicial resultaron ser más costosos que los tratamientos más diluidos. Analizando los tratamientos controles de cada dilución, la dilución más concentrada incrementó sus costos en 20%. Entre los

Cuadro 9. Efecto de tratamientos enzimáticos en análisis de color en jugo de tamarindo segunda fase.

T ¹	Dilución (Agua:Pulpa)	Tiempo de incubación (horas)	Fenoles totales (ppm EAG ²) Media ± D.E. ³	Color		
				L	a	b
				Media ± D.E.	Media ± D.E.	Media ± D.E.
1	3:1	0 ⁴	3529 ± 26.7 ^{B5}	56.1 ± 0.02 ^B	4.11 ± 0.01 ^B	25.9 ± 0.02 ^A
2		3	4396 ± 153.1 ^A	43.9 ± 0.07 ^D	9.39 ± 0.10 ^A	24.8 ± 0.06 ^B
3	7:1	0	1821 ± 82.4 ^D	58.6 ± 0.13 ^A	0.58 ± 0.04 ^D	20.7 ± 0.07 ^D
4		3	2104 ± 89.0 ^C	51.4 ± 0.04 ^C	2.96 ± 0.03 ^C	22.5 ± 0.05 ^C
CV ⁶ (%)			3.72	0.15	0.10	0.24

¹Tratamiento. ²Equivalentes en ácido gálico. ³Desviación estándar. ⁴Tratamiento sin enzima ni incubación. ⁵Medias con letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas (P<0.05). ⁶Coefficiente de variación.

Cuadro 10. Costos variables para producción de jugo de tamarindo segunda fase (1 Litro).

Descripción	Unidad	P _U ² (L)	Dilución Agua:Pulpa (3:1)				Dilución Agua:Pulpa (7:1)			
			0 horas ¹		3 horas		0 horas		3 horas	
			Cantidad	P _T ³ (L)	Cantidad	P _T (L)	Cantidad	P _T (L)	Cantidad	P _T (L)
Pulpa de tamarindo	G	0.11	333	36.70	333	36.70	142.8	15.7	142.8	15.70
Enzima ⁴	mL	5.71	-	-	1.00	5.71	-	-	1	5.71
Energía baño maría	Hora	26.39	-	-	3	79.17	-	-	3	79.17
Agua	L	1.53	1	1.53	1	1.53	1	1.53	1	1.53
Azúcar	Kg	12.37	0.03	0.37	0.03	0.37	0.03	0.37	0.03	0.37
Total (colocado)				38.60		123.48		17.60		102.48
Total (rendimiento)				49.05		139.05		21.73		114.12
Tasa de cambio lempiras a dólares				19.76						

¹Tratamiento sin enzima ni incubación. ²Precio unitario en Lempiras. ³Precio total en Lempiras. ⁴Pectinex[®] Ultra SP –L.

tratamientos con enzima de cada dilución, el tratamiento de la dilución más concentrada resultó ser 11% más costoso. Pero en general el tratamiento con enzima comparado con el control en cada dilución resultó 65% y 73% más costoso respectivamente. Cabe recalcar que los tratamientos con mejores características físico-químicas y sensoriales preferidas por los panelistas fueron los tratamientos más concentrados. El tratamiento con enzima de la dilución más concentrada resultó ser más costoso pero es el de mejores características sensoriales y físico-químicas de todos los tratamientos. Al producir jugo de tamarindo con pulpa a nivel industrial el costo se incrementa ya que es necesario más uso de maquinaria para poder manipular el mismo. Así como también más gastos en almacenamiento, manipulación, manejo de aguas, limpieza de equipos, entre otros. Por otro lado, la ventaja de producir jugo de tamarindo sin pulpa es su fácil manejo, procesamiento y mantenimiento. Como también, el jugo inoculado con la enzima es de mejor calidad ya que contiene mayor cantidad de componentes extraídos mediante el proceso enzimático.

4. CONCLUSIONES

- Se obtuvo un incremento promedio de 5% en el rendimiento de obtención de jugo debido al tratamiento enzimático (primera fase).
- Se obtuvo un incremento promedio de 10.5% en el rendimiento de obtención de jugo debido al tratamiento enzimático (segunda fase).
- Hubo un incremento significativo en sólidos solubles, turbidez y fenoles totales debido al tratamiento enzimático realizado, independientemente de la cantidad de pulpa de tamarindo utilizada.
- El color fue influenciado por la cantidad de pulpa inicial presente en la mezcla.
- Los tratamientos con diluciones más concentradas fueron los más aceptados por los panelistas con una evaluación entre me gusta poco y moderadamente.
- El tratamiento enzimático elevó los costos variables a nivel laboratorio en 65 y 73% para los tratamientos de la segunda fase, respectivamente.

5. RECOMENDACIONES

- Validar el método creando un filtro de mayor tamaño para producción de jugo de tamarindo a nivel industrial sin necesidad de equipos costosos.
- Realizar constantes movimientos al jugo durante el tiempo de incubación para mejor acción de la enzima.
- Aumentar los sólidos solubles (°Brix) para las pruebas sensoriales.
- Realizar análisis de costos a nivel industrial incluyendo costos fijos y gastos por depreciación de maquinaria al procesar jugo de tamarindo con pulpa y jugo de tamarindo clarificado.
- Probar este proceso con otras frutas de interés comercial para la PHF.

6. LITERATURA CITADA

Aerokyn. 2012. Aerokyn mascarilla tipo I. En línea. Consultado el 1 septiembre 2012. Disponible en: <http://www.aerokyn-masques.com/mascarillas-quirurgicas/mascarillas-quirurgicas-1.html>

Anusic, N. 2011. Identificación y cuantificación de polifenoles en yerba mate y brebajes. Universidad de Belgrano. Departamento de Investigaciones. Facultad de Ciencias Exactas. Carrera Farmacia. Buenos Aires. Argentina. 80 p.

AOAC (Asociation of Official Analytical Chemists). 1997. Official Methods of Analysis. 16va Edición. Editorial AOAC International. Maryland, Estados Unidos de América.

Arranz, S., F. Saura-Calixto, S. Shaha, P. Kroon. 2009. Alto contenido de polifenoles no extraíbles en frutas (inglés). Journal of Agricultural and Food Chemistry. Estados Unidos de América. 189 p.

Ávila, G., M. Fonseca, 2008. Calidad microbiológica de jugos preparados en hogares de bienestar familiar en la zona norte de Cundinamarca. Pontificia Universidad Javeriana. Tesis para título de Microbiólogo Industrial. Colombia. 49 p.

Cardona Ponce, J. 2005. Extracción enzimática y análisis cualitativo del jugo de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.). Tesis Ing. Agr. Alim. El Zamorano, Honduras, Escuela Agrícola Panamericana Zamorano. 31 p.

Carvajal Aldaz, D. 2007. Optimización de las características físicas y químicas del puré de manzana (*Malus domestica*) para la extracción de su esencia. Tesis Ing. Agr. Alim. El Zamorano, Honduras, Escuela Agrícola Panamericana Zamorano. 26 p.

Casares, A. 2010. Análisis de polifenoles en los vinos mediante técnicas de separación. Escuela Universitaria de Ingeniería Técnica Industrial de Barcelona. Tesis para optar por el título de Ingeniería Técnica Industrial especialidad Química. España. 102 p.

Codex Alimentarius. 2000. En línea. Consultado el 10 de junio de 2011. Disponible en: www.codexalimentarius.net/download/standards/.../CXS_247s.pdf

Das, K., A. Solehah, V.T. Balaumani, M.A. Amiza. 1994. Enzimas para la extracción y estabilización del color y sabor en jugo de naranja (inglés). Journal of Food Science and Technology. Estados Unidos de América. 511 p.

Díaz, J. 2004. Descubre los frutos exóticos. Ediciones Norma Capitol. Madrid. 213 p.

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, IT). 2006. Ficha Técnica productos frescos y procesados: producción de pulpa de tamarindo. Consultado en línea el 30 de mayo 2011. Disponible en http://www.fao.org/inpho_archive/content/documents/vlibrary/AE620s/Pprocesados/FRU13.HTM

FDA (Food and Drug Administration). 2012. BAM – Bacteriological Analytical Manual (inglés). En línea. Consultado el 10 septiembre 2012. Disponible en: <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm109656.htm>

Food info. 2012. Pectina. Consultado el 30 de agosto de 2012. Disponible en: <http://www.food-info.net/es/qa/qa-wi6.htm>

Fraile, M.E., A. Martínez, M.D. García, R. Slomianski. 2008. Nutritivas y apetecibles: conozca de leguminosas comestibles. Parte II. Tubérculos y algunos árboles interesantes. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. México. 59 p.

Gómez, O. 2004. Dependencia en la temperatura de los cambios en atributos sensoriales, degradación de ácido ascórbico e inactivación enzimática durante el tratamiento de pasteurización en puré y néctar de tamarindo. Universidad de las Américas Puebla. Tesis para obtención de título en Maestría de Ciencia de Alimentos. México. 85 p.

González, S. 2009. Diseño mecánico de un equipo para medida de la viscosidad en fluidos no newtonianos. Universidad Politécnica de Cartagena. Tesis para título de Ingeniería Industrial. Colombia. 113 p.

Gorocica, A. y G. Rivera. 2011. Despulpado enzimático del tamarindo *Tamarindus indica* L. Investigación del Instituto Tecnológico de Mérida. México. pp. 56.

Lenntech. 2011. Soluciones para tratamientos de agua: turbidez. En línea. Disponible en: <http://www.lenntech.es/turbidez.htm>

León, G. y E. Rosero. 2009. Obtención de jugo clarificado de uvilla (*physalis peruviana* L.), utilizando degradación enzimática y microfiltración tangencial. Universidad Técnica del Norte. Tesis para título de Ingeniería Agroindustrial. Ecuador. 197 p.

López, L. 2010. Efecto de la incorporación de extracto de tamarindo (*Tamarindus indica*) con actividad antioxidante en la elaboración y funcionalidad de películas biodegradables proteína-almidón. Tesis Universidad Autónoma Metropolitana. Tesis para optar por el título de Maestro en Biotecnología. México. 131 p.

Mack León, R. 2011. Efecto de dos pectinasas comerciales y su tiempo de incubación en las características físico - químicas y sensoriales de un puré de guayaba roja. Tesis Ing. Agr. Alim. El Zamorano, Honduras, Escuela Agrícola Panamericana Zamorano. 15 p.

Muñoz, K., K. Bravo, P. Zapata, J. Londoño. 2007. Caracterización preliminar del enzima polifenol oxidasa en frutas tropicales: implicaciones en su proceso de industrialización. Universidad Tecnológica de Pereira. Colombia. 164 p.

Novozymes. 2007. Ficha técnica enzima Pectinex[®] Ultra SP – L. Dinamarca. 3 p.

Olson, A. 2011. A juicy Project: extracting Apple juice with pectinasa. En línea. Consultado el 24 de mayo de 2012. Disponible en: http://www.sciencebuddies.org/science-fair-projects/project_ideas/BioChem_p010.shtml

Organización Mundial de la Salud (OMS). 2010. Folleto de las tres cincos. En línea. Consultado el 10 junio de 2011. Disponible en: http://www.who.int/foodsafety/consumer/3x5_SA_sp.pdf

Ovando, S.L. y W. Wallszewski. 2005. Preparativos de celulastas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Red de revistas científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal. México. 133 p.

Panisello, J. 2004. Las 100 preguntas que siempre quiso hacer: mitos y verdades en torno a la alimentación. Glosa. España. 79 p.

Parrota, J. 1990. *Tamarindus indica* L.: Familia de las leguminosas. Subfamilia de las casias. US. Forest Service. Washington DC. Estados Unidos de América. 27 p.

Ramis, M. 1996. Microbiología de los alimentos: características de los patógenos microbianos. Comisión Internacional en Especificaciones Microbiológicas para Alimentos. Acribia. España. 606 p.

Rastogi, N.K., G. Rajesh, T.R. Shamala. 1998. Optimization of enzymatic degradation of coconut residue. Journal of the Science of Food and Agriculture. 130 p.

Reglamento Técnico Centroamericano. 2009. Alimentos, Criterios microbiológicos para la inocuidad de alimentos. Centroamérica. 45 p.

Rivera, G. 2000. Uso de enzimas en la industria alimentaria. Instituto Tecnológico Superior de Calkini en el Estado de Campeche. México. 13 p.

Rodríguez, J., J. Escalona, R. Rodríguez, Y. Rodríguez. 2010. Validación del método de cuantificación de polifenoles en el extracto fluido de *Tamarindus indica*. Departamento de farmacia, Universidad de oriente. Santiago de Cuba. 54.

Rodríguez, J., A. Lafourcade, J.C. Escalona, A. Iraizoz. 2011. Preformulación de tabletas de *Tamarindus indica* L. Revista Cubana de farmacia. Cuba. 45(4): 1-9.

Ronald, A. 2007. Frutoterapia. Nutrición y salud – el poder terapéutico de las frutas, hortalizas, verduras, cereales, legumbres y plantas. Segunda edición. Editorial Edaf. Buenos Aires - Argentina. 121 p.

Shiu-ying, H. 2005. Plantas alimenticias de la China (inglés). The Chinese University Press. Hong Kong. 230 p.

Siddhuraju, P. 2007. Actividad antioxidante de compuestos polifenólicos extraídos de semillas secas de *Tamarindus indica* (inglés). Swiss Society of Food Science and Technology. Estados Unidos de América. 990 p.

Sigma Aldrich. 2012. Ficha técnica de Folin – Cioucalteu (inglés). En línea. Consultado el 03 septiembre 2012. Disponible en: <http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Datasheet/6/47641dat.Par.0001.File.tmp/47641dat.pdf>

Talcott, S., S. Percival, J. Pittet-Moore, C. Celoria. 2003. Composición fitoquímica y estabilidad antioxidante de maracuyá amarilla (*Passiflora edulis*). Journal of Agriculture and Food Chemistry. 941 p.

Universidad de Barcelona. 2011. Polifenoles, alimentación y salud: conferencia internacional en Sitges. En línea. Consultado el 03 septiembre 2012. Disponible en: http://www.ub.edu/web/ub/es/menu_eines/noticies/2011/10/042.html

Vaillant, F. 2001. Clarificación en jugos concentrados a partir de pulpa de frutos tropicales mediante tratamientos enzimáticos, microfiltración tangencial y evaporación osmótica. (francés). ENSIA-SIARC. Tesis Doctoral. Francia. 139 p.

Víctor Méndez, M.J. 2006. Evaluación de la estabilidad del vino de naranja (*Citrus sinensis*) usando un agente y una enzima clarificante. Tesis Ing. Agr. Alim. El Zamorano, Honduras, Escuela Agrícola Panamericana Zamorano. 30 p.

Yegres, S., S. Sánchez, M. Belmar, R. Wallis, D. Belmar. 2001. Producción de enzimas pécticas. Laboratorio Clínico Universitario. Universidad de Oriente. Cumaná. Venezuela. 24 p.

7. ANEXOS

Anexo 1. Ficha Técnica enzima Pectinex[®] ULTRA SP-L (Novozymes 2007).

Pectinex[®] Ultra SP-L

Description

Pectinex Ultra SP-L is a highly active pectolytic enzyme preparation produced by a selected strain of *Aspergillus aculeatus*. This enzyme preparation contains pectolytic and a range of hemicellulolytic activities. It has the ability to disintegrate plant cell walls.

Product Properties

Product Type

Pectinex Ultra SP-L is a brownish liquid with a slight smell typical of fermented products and a pH of approx. 4.5.

Activity

Pectinex Ultra SP-L has a standard activity of 26,000 IPG/ml (pH 3.5). The standard activity is determined by the measurement of the viscosity reduction of a solution of pectic acid at pH 3.5 and 20°C (68°F). See the Analytical Method for further information.

Solubility

The active components of Pectinex Ultra SP-L are readily soluble in water at all concentrations that occur in normal usage. Turbidity which may occur in the enzyme preparation has no influence on the volumetric activity or handling characteristics of the product.

Food-grade status

The product complies with FAO/WHO, JECFA and FCC specifications for food-grade enzymes, supplemented by maximum limits of 10^2 moulds/g. The product is bottled aseptically after sterile filtration and therefore practically germ-free.

Packaging

See the standard Packaging List for more packaging information.

Application

The preparation is especially designed for the treatment of fruit and vegetable meshes and the maceration of plant tissues. Soluble and insoluble pectins as well as haze-provoking polysaccharides are also efficiently degraded. Pectinex Ultra SP-L applied on fruit and vegetable meshes and/or pomaces leads to drastically increased capacities in solid/liquid separation (e.g. press, decanter) and higher juice yields.

Reaction Parameters

Pectinex Ultra SP-L Activity

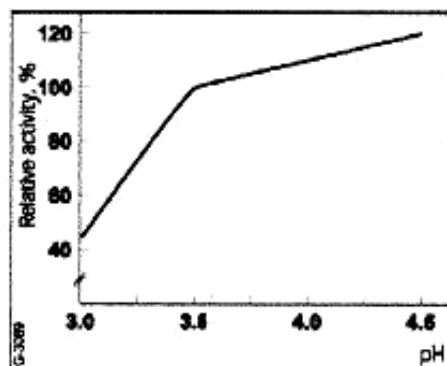


Fig. 1. Pectinase activity versus pH.
Polygalacturonase activity at 20°C (68°F)

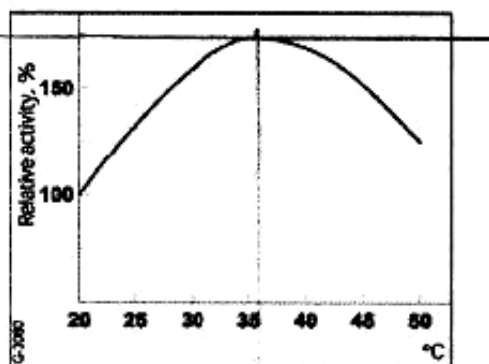


Fig. 2. Pectinase activity versus temperature.
Polygalacturonase activity at pH 3.5

Safety

Enzymes are proteins and inhalation of dust or aerosols may induce sensitization and may cause allergic reactions in sensitized individuals. Some enzymes may irritate the skin, eyes and mucous membranes upon prolonged contact.

The product may create easily inhaled aerosols if splashed or vigorously stirred. Spilled product may dry out and create dust.

Spilled material should be flushed away with water (avoid splashing). Left-over material may dry out and create dust.

A Material Safety Data Sheet is supplied with all products. See the Safety Manual for further information regarding how to handle the product safely.

Anexo 2. Interacción entre variables evaluadas con análisis estadístico para jugo de tamarindo primera fase.

Interacción ¹	pH	Sólidos Solubles (% °Brix)	Turbidez (abs)	Viscosidad (Pa·s)	Fenoles totales (mg/L EAG ²)	L	Color ⁵ a	b
	P ³	P	P	P	P	P	P	P
Dilución ⁴	0.0019	<.0001	0.2338	0.6507	<.0001	0.0224	0.0262	0.0003
Tiempo ⁵	0.3097	0.0005	<.0001	0.4231	<.0001	0.2522	0.9758	0.1811
Bloques	0.0005	0.0605	0.0512	0.0002	0.4414	<.0001	0.0001	0.0022
Dilución*Tiempo ⁶	0.8004	0.0502	0.2820	0.5536	<.0001	0.3667	0.7673	0.8508

¹Interacción entre factores evaluados a los tratamientos. ²Equivalentes en ácido gálico. ³Probabilidad. ⁴Dilucion significa 13:1 o 21:1. ⁵Tiempo de incubación en las muestras inoculadas. ⁶Interacción entre factores dilución*tiempo.

Anexo 3. Interacción entre variables de prueba sensorial de aceptación y rendimiento con análisis estadístico para jugo de tamarindo.

Interacción ¹	Color	Olor	Viscosidad	Acidez	Sabor	Aceptación General	Rendimiento
	P ²	P	P	P	P	P	P
Dilución ³	<.0001	0.0133	0.0260	0.0337	<.0001	<.0001	<.0001
Tiempo ⁴	0.0026	0.0648	0.7427	0.8721	0.6893	0.5475	<.0001
Bloques	0.4815	0.7065	0.2469	0.0710	0.1703	0.0100	0.6053
Dilución*Tiempo ⁵	0.1010	0.3990	0.1863	0.3505	0.7214	0.0919	0.5453

¹Interacción entre factores evaluados a los tratamientos. ²Probabilidad. ³Dilucion significa 13:1 o 21:1. ⁴Tiempo de incubación en las muestras inoculadas. ⁵Interacción entre factores dilución*tiempo.

Anexo 4. Boleta para análisis sensorial prueba de aceptación.

Evaluación Sensorial: Jugo de tamarindo

Nombre: _____

Fecha: _____

Para realizar esta prueba, limpiar el paladar con galleta y agua. Luego analice los seis atributos presentados para cada muestra. Marcar una X en el cuadro según su aceptación del producto en cada atributo.

Escala para atributos de ACEPTACIÓN

- | | |
|-------------------------------|----------------------------|
| 1. Me disgusta extremadamente | 6. Me gusta poco |
| 2. Me disgusta mucho | 7. Me gusta moderadamente |
| 3. Me disgusta moderadamente | 8. Me gusta mucho |
| 4. Me disgusta poco | 9. Me gusta extremadamente |
| 5. Nime gusta ni me disgusta | |

Muestra: _____

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Color									
Olor									
Viscosidad									
Acidez									
Sabor									
Aceptación General									

Observaciones:

Muestra: _____

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Color									
Olor									
Viscosidad									
Acidez									
Sabor									
Aceptación General									

Observaciones:

Muestra: _____

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Color									
Olor									
Viscosidad									
Acidez									
Sabor									
Aceptación General									

Observaciones:

Muestra: _____

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Color									
Olor									
Viscosidad									
Acidez									
Sabor									
Aceptación General									

Observaciones:

Anexo 5. Interacción entre variables evaluadas con análisis estadístico para jugo de tamarindo segunda fase.

Interacción ¹	Rendimiento (%)	pH	Sólidos Solubles (% °Brix)	Turbidez (abs)	Viscosidad (Pa·s)	Fenoles totales (mg/L EAG ²)	Color		
	P ³	P	P	P	P	P	L P	a P	b P
Dilución ⁴	0.0081	<0.0001	<.0001	0.0003	0.0058	<.0001	0.0256	0.2897	0.0584
Tiempo ⁵	<.0001	0.0002	0.0059	0.0041	0.8067	<.0001	0.0433	0.3887	0.0867
Bloques	0.6913	0.3902	0.8304	0.4491	0.3927	0.6124	0.4214	0.3326	0.6045
Dilución*Tiempo ⁶	0.1567	0.2782	0.2828	0.5654	0.3847	<.0001	0.0742	<.0001	0.4534

¹Interacción entre factores evaluados a los tratamientos. ²Equivalentes en ácido gálico. ³Probabilidad. ⁴Dilucion significa 3:1 o 7:1. ⁵Tiempo de incubación en las muestras inoculadas. ⁶Interacción entre factores dilución*tiempo.