

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

ESCUELA DE POSGRADO

MAESTRÍA EN TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



**“OPTIMIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO
ASCÓRBICO, TIEMPO Y TEMPERATURA PARA INACTIVAR
POLIFENOLOXIDASA EN JUGO DE CAÑA MEDIANTE
METODOLOGÍA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA”**

Presentado por:

MARTHA ELINA TESÉN ARROYO

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAGÍSTER SCIENTIAE EN TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

Lima - Perú

2011

INDICE GENERAL

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTO	ii
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	iv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISION DE LITERATURA	3
2.1 LA CAÑA DE AZÚCAR	3
2.1.1 Generalidades	3
2.1.2 Clasificación Botánica de la Caña de Azúcar	3
2.1.3 Constituyentes de la caña de azúcar	4
2.1.4 Materias No Azúcares Colorantes Presentes en la Caña de Azúcar	4
2.2 JUGO DE CAÑA	4
2.3 LAS POLIFENOLOXIDASAS (PFO)	5
2.3.1 Categorización de la Polifenoloxidasa	5
2.3.2 Mecanismo de Acción de las Polifenoloxidasa	7
2.4 PARDEAMIENTO ENZIMÁTICO	8
2.5 INHIBICIÓN DE LA POLIFENOLOXIDASA (PFO)	10
2.5.1 Inhibidores Enzimáticos de la Polifenoloxidasa	12
2.5.1.1 Agentes reductores	12
2.5.1.2 Acidulantes	12
2.5.1.3 Quelantes	12
2.5.1.4 Agentes acomplexantes	12
2.5.1.5 Inhibidores de enzimas	13
2.5.2 Inhibición de la Polifenoloxidasa por Acción Calor.	14

2.6 ACIDO ASCORBICO	15
2.7 METODOLOGÍA DE SUPERFICIE RESPUESTA	16
2.8 NATURALEZA SECUENCIAL DE LA METODOLOGÍA DE SUPERFICIES DE RESPUESTA	18
2.8.1 Método de máxima pendiente en ascenso	18
2.9 DISEÑOS EXPERIMENTALES PARA AJUSTAR SUPERFICIES DE RESPUESTA	19
2.9.1 Diseños para ajustar modelos de primer orden	20
2.9.2 Diseños para ajustar modelos de segundo orden	20
2.9.3 Diseño Box-Behnken	21
2.10 TÉCNICAS DE OPTIMIZACIÓN	23
2.11 EVALUACIÓN SENSORIAL	23
2.11.1 Campo de Aplicación del Análisis Sensorial	24
2.11.2 Clasificación de las Pruebas Sensoriales	25
3. MATERIALES Y METODOS	27
3.1 LUGAR DE EJECUCIÓN	27
3.2 MATERIA PRIMA	27
3.3 MATERIALES	27
3.4 EQUIPOS	28
3.5 REACTIVOS	28
3.6 MÉTODOS DE ANÁLISIS	28
3.6.1 Análisis Físico Químicos	28
3.6.2 Evaluación Sensorial	29
3.6.3 Análisis de la Inactivación Térmica	31
3.7 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	31
3.8 DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO	34
4. RESULTADOS Y DISCUSION	37
4.1 CARACTERIZACIÓN DEL JUGO DE CAÑA	37
4.2 EFECTO DEL ÁCIDO ASCÓRBICO, TIEMPO Y TEMPERATURA EN LA INACTIVACIÓN DE LA POLIFENOLOXIDASA EN JUGO DE CAÑA.	38
4.3 OPTIMIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO ASCÓRBICO, TEMPERATURA Y TIEMPO PARA LA	

INACTIVACIÓN DE LA ENZIMA POLIFENOLOXIDASA EN JUGO DE CAÑA	44
4.4 EVALUACION SENSORIAL DEL SABOR, COLOR Y ACEPTABILIDAD DEL JUGO DE CANA CON TRATAMIENTO OPTIMO DE INACTIVACION ENZIMATICA	47
V. CONCLUSIONES	50
VI. RECOMENDACIONES	51
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
VIII. ANEXOS	60

ÍNDICE DE CUADROS

	Pag
Cuadro 1. Composición Química del Jugo de Caña	6
Cuadro 2. Diseño de Box-Benken Para Tres Variables	22
Cuadro 3. Variables Independientes, Códigos y Valores Utilizados en la Optimización	34
Cuadro 4. Matriz Para el Diseño Box-Behnken	35
Cuadro 5. Características del Jugo de Caña	37
Cuadro 6. Resultados del Porcentaje de Inactivación de la Enzima Polifenoloxidasa en Jugo de Caña	38
Cuadro 7. Análisis de Varianza Para Porcentaje de Inactivación de Polifenoloxidasa	42
Cuadro 8. Niveles de Parámetros de Tratamiento en la Maximización de la Inactivación de la Enzima Polifenoloxidasa	46
Cuadro 9. Resultados de la Prueba del Grado de Satisfacción del Jugo de Caña	47
Cuadro 10. Resultados de la Prueba de Comparación de Medias Pareadas	48

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pag
Figura 1. Mecanismo Cinético Propuesto para la Oxidación de o-difenol (catecol (a) y un monofenol (fenol (b))).	8
Figura 2. Transformación de Fenoles en Polímeros Coloreados	9
Figura 3a. Estructura de Algunos Sustratos Naturales de la Polifenoloxidasa.	11
Figura 3b. Estructura de Algunos Sustratos Naturales de la Polifenoloxidasa.	11
Figura 4. Diseño De Box- Behnken Para Tres Factores	22
Figura 5. Metodología General del Análisis Sensorial	30
Figura 6. Etapas de la Metodología Experimental	31
Figura 7. Diagrama de Flujo Para la Obtención del Jugo de Caña	32
Figura 8. Gráfico del Efecto de las Variables en la Inactivación de la Enzima Polifenoloxidasa	41
Figura 9. Representación de los Efectos de las Variables en la Inactivación de la Enzima Polifenoloxidasa	41
Figura 10. Superficie de Respuesta de la Inactivación de la Enzima Polifenoloxidasa	44
Figura 11. Contornos de Superficie de Respuesta Para Establecer los Parámetros Óptimos de Tratamiento	45
Figura 12. Contornos de Superficie de Respuesta Para Establecer los Parámetros Óptimos de Tratamiento	45
Figura 13. Contornos de Superficie de Respuesta : Punto Óptimo	46

INDICE DE ANEXOS

	Pag
Anexo 1. Formato de la Prueba Sensorial del Jugo de Caña	60
Anexo 2. Resultados de la Prueba Sensorial del Jugo de Caña: Tratamiento Óptimo (418)	61
Anexo 3. Resultados de la Prueba Sensorial del Jugo de Caña: Sin Tratamiento (347)	64
Anexo 4. Análisis Estadístico de la Evaluación Sensorial del Sabor, Color y Aceptabilidad del Jugo de Caña	67
Anexo 5. Lecturas de Absorción Para la Construcción del Espectro de Máxima Absorción de la Enzima de Polifenoloxidasa	69
Anexo 6. Espectro de Máxima Absorción de la Enzima de Polifenoloxidasa	71
Anexo 7. Modelo Box Behnken de los Tratamientos para la Inactivación de la Enzima Polifenoloxidasa	72
Anexo 8. Resultados del Porcentaje de Inactivación de Polifenoloxidasa Aplicando los Tratamientos en Jugo de Caña	73
Anexo 9. Resultados Experimentales de laboratorio: Aplicación de los Tratamientos en el Jugo de Caña Según Modelo Box Behnken	75
Anexo 10. Resultados Experimentales de Laboratorio: Extracción de la Enzima del Jugo de Caña	76
Anexo 11. Lecturas de Absorción de los Tratamientos de Jugo de caña	77
Anexo 12. Resultados de la prueba T: Color del Jugo de Caña	78
Anexo 13. Resultados de la prueba T: Sabor del Jugo de Caña	79
Anexo 14. Resultados de la prueba T: Aceptabilidad del Jugo de Caña	80

RESUMEN

La Polifenoloxidasa PFO, es una de las enzimas más estudiadas en la industria de los alimentos debido a que es la responsable de las reacciones de pardeamiento enzimático en frutas y verduras. Una de las razones por las cuales es importante su estudio es porque comercialmente es indeseable, ya que modifica las propiedades sensoriales, nutricionales y en general de calidad que perjudica la comercialización de un producto.

El objetivo principal de esta investigación fue determinar las condiciones óptimas de la concentración de ácido ascórbico, temperatura y tiempo del tratamiento térmico adecuadas para inactivar la enzima polifenoloxidasa en jugo de caña, aplicando la metodología de superficie de respuesta.

Para cumplir con el objetivo propuesto, primero se extrajo el jugo de caña para ser caracterizado en cuanto a grados brix, pH y azúcares reductores, encontrándose dentro de los parámetros de calidad del jugo de caña. Luego de ser caracterizado se aplicaron los tratamientos de acuerdo al diseño experimental de Box Behnken. Inicialmente se agregó ácido ascórbico en concentraciones de 0,1; 0,15 y 0,2%, luego se aplicó tratamiento térmico a temperaturas de 70, 80 y 90°C por un tiempo 2, 4 y 6 minutos; además de los tratamientos mencionados se contó con un tratamiento control.

Después de aplicados los tratamientos se extrajo la enzima Polifenoloxidasa (PFO) del jugo de caña y se determinó su nivel de inactivación. Mediante la aplicación de metodología de superficie de respuesta se obtuvo que el tratamiento óptimo siendo aquel cuya concentración es de 0,17% de ácido ascórbico a una temperatura de 86,8°C por 4,15 minutos, este tratamiento es capaz de conseguir un 95,6% de inactivación de la polifenoloxidasa.

Así mismo se aplicó la prueba sensorial para determinar el grado de satisfacción del jugo de caña del tratamiento optimizado en comparación con el jugo sin tratamiento encontrándose que el jugo de caña sometido a tratamiento óptimo presenta una mejor calificación en relación a las características de color y aceptabilidad general (me agrada mucho).

ABSTRACT

Polyphenoloxidase PPO, is one of the most studied enzymes in the food industry because it is responsible for enzymatic browning reactions in fruits and vegetables. One of the reasons why their study is important because it is commercially undesirable because it changes the sensory properties, nutritional quality and generally harms the marketing of a product.

The main objective of this research was to determine the optimal conditions for ascorbic acid concentration, temperature and time appropriate heat treatment to inactivate the enzyme polyphenoloxidase cane juice, using the response surface methodology.

To meet the objective, first extracted cane juice to be characterized in terms of degrees brix, pH and reducing sugars, being within the quality parameters of sugarcane juice. After being characterized treatments were applied according to the Box Behnken experimental design. Initially ascorbic acid was added in concentrations of 0.1, 0.15 and 0.2%, after heat treatment was applied at temperatures of 70, 80 and 90 ° C for a while 2, 4 and 6 minutes, in addition to the treatments mentioned, it had a control treatment.

After the treatments applied enzyme was extracted polyphenoloxidase (PPO) sugar cane juice and determined their level of inactivation. Through the application of response surface methodology was obtained that the optimal treatment being the one whose concentration is 0.17% ascorbic acid at a temperature of 86.8 ° C for 4.15 minutes, this treatment is able to get a 95.6% inactivation of polyphenoloxidase.

Also sensory test was used to determine the degree of satisfaction cane juice optimized treatment compared with untreated juice was found that cane juice under optimal treatment has a better score in relation to the color characteristics and acceptability general (pleases me very much).

I. INTRODUCCIÓN

El jugo de caña es una bebida que se consume de forma natural, es muy apreciada por sus propiedades energéticas y refrescantes. Sin embargo sólo se encuentra disponible en las cercanías de las zonas cañeras en carreteras o mercados en donde se obtiene el jugo de manera artesanal.

El jugo después de ser extraído, debe ser consumido de inmediato debido al rápido pardeamiento enzimático. Este pardeamiento dificulta la producción del jugo de caña y condiciona el proceso de obtención, envasado y comercialización.

El pardeamiento enzimático es el principal problema para la industria de alimentos debido a los cambios que causa en la apariencia y propiedades organolépticas de frutas y vegetales reduciendo el grado de aceptación del producto (Millan y Roa, 2001).

El pardeamiento enzimático es causado por la acción de la enzima polifenoloxidasas. Esta enzima al ocurrir la ruptura de las células se pone en contacto con los sustratos fenólicos y en presencia de oxígeno inicia la reacción que conduce a la formación de quinonas, las que reaccionan entre sí con otros compuestos formando melaninas, que son complejos macromoleculares de color oscuro (Villegas *et. al*, 2006).

La actividad de la enzima polifenoloxidasas presente en frutas y vegetales puede ser inhibida por calentamiento o por remoción de alguno de sus componentes necesarios tales como: el oxígeno, Cu^{2+} o sustrato. Los agentes reductores, antioxidantes e inhibidores enzimáticos, previenen el pardeamiento reduciendo químicamente las ortoquinonas a difenoles coloreados, inhibiendo la actividad de la enzima por disminución del pH, o quelando el Cu^{2+} en el alimento (Gasull y Becerra, 2006).

De los métodos existentes para la inactivación de la enzima polifenoloxidasa, el tratamiento térmico y uso de aditivos son los que se emplean más, sin embargo presentan inconvenientes ya que la aplicación de calor y adición de aditivos produce cambios indeseables en las características sensoriales del alimento (Schmidt y Pennacchioti, 2001).

La metodología de superficie de respuesta, es una metodología experimental y de modelación que permite encontrar condiciones de operación óptimas de un proceso para mejorar la calidad de un producto. La metodología de superficie de respuesta consiste en tres palabras claves: diseño, modelo y optimización (Gutiérrez y De La Vara, 2008).

El objetivo principal de este trabajo de investigación fue determinar las condiciones óptimas de la concentración de ácido ascórbico, temperatura y tiempo del tratamiento térmico adecuadas para inactivar la enzima polifenoloxidasa en jugo de caña a través de la aplicación de la metodología de superficie de respuesta, para lo cual se plantearon como objetivos específicos:

- Evaluar el efecto del ácido ascórbico, tiempo y temperatura en la inactivación de la polifenoloxidasa en jugo de caña.
- Determinar los parámetros óptimos de concentración de ácido ascórbico, temperatura y tiempo para inactivar la polifenoloxidasa en jugo de caña mediante la metodología de superficie de respuesta.
- Evaluar sensorialmente el sabor, color y la aceptabilidad general del jugo de caña del tratamiento óptimo de inactivación enzimática.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 LA CAÑA DE AZÚCAR

2.1.1 Generalidades

La caña de azúcar en el Perú se cultiva en la costa, selva y valles interandinos. Sin embargo, es en la costa donde se localiza la mayor área sembrada, debido a que presenta condiciones climáticas y edáficas únicas, que permite sembrar y cosechar durante todo el año, y obtener rendimientos excepcionales (Che, 1990).

La caña de azúcar es una hierba gigante que pertenece al género *Saccharum*. Las cañas llamadas nobles o nativas, que han sido todas las cañas cultivadas en las regiones tropicales y semitropicales del mundo, hasta la introducción de las variedades nacidas de semillas, pertenecen todas a la misma especie: *Saccharum officinarum*. Las amplias variaciones en el tamaño, color y aspecto son resultado de las diversas condiciones de terreno, clima y métodos de cultivo (Spencer, 1967).

2.1.2 Clasificación Botánica de la Caña de Azúcar

Según Castillo (2001), la clasificación taxonómica de la caña de azúcar es la siguiente:

División	: Fanerógamas
Sub División	: Angiospermas
Clase	: Monocotiledóneas
Orden	: Glumales
Familia	: Gramíneas
Tribú	: Andropogoneas
Sub tribu	: Sacarineae

Género : Saccharum
Especies : S. Officinarum, S. Barberi, S. Sinense.

2.1.3 Constituyentes de la Caña de Azúcar

El tronco de la caña de azúcar está compuesto por una parte sólida llamada fibra y una parte líquida, el jugo, que contiene agua y sacarosa. En ambas partes también se encuentran otras sustancias en cantidades muy pequeñas. Las proporciones de los componentes varían de acuerdo con la variedad (familia) de la caña, edad, madurez, clima, suelo, método de cultivo, abonos, lluvias, riegos, etc. Sin embargo, los valores de referencia general son: agua de 73 a 76 %; sacarosa de 8 a 15 % y fibra de 11 a 16 % (Che, 1990).

2.1.4 Materias No Azúcares Colorantes Presentes en la Caña de Azúcar

2.1.4.1 Polifenoles

Los polifenoles presentes en la caña de azúcar son de gran interés porque reaccionan particularmente con el hierro y el oxígeno y forman compuestos de colores oscuros; estos polifenoles incluyen al tanino, derivado del ácido proto-catético, hidrófilos fenólicos de la antocianina de la corteza de la caña, y la sacaretina de la fibra de caña. Todos estos polifenoles se oscurecen en contacto con el aire y las soluciones alcalinas formando compuestos de colores oscuros con el ión férrico (Pedrosa, 1975).

2.1.4.2 Compuestos de Aminas

En el jugo de caña existe pocas centésimas de porcentaje de nitrógeno la mitad es en forma de amoníaco y el resto como aminoácidos y amidas. Entre los aminoácidos encontrados se tiene a glicina, valina y leucina; estos compuestos son de importancia, porque reaccionan con pequeñas cantidades de azúcares reductores, formando compuestos coloreados (Pedrosa, 1975).

2.2 JUGO DE CAÑA

Según NTP 207.001:2005, define el jugo de caña a la fase líquida que se extrae de la caña de azúcar (INDECOPI, 2005).

El jugo de caña tiene un grado Brix de 10 a 18, un pH de 5,0 a 5,6, abundantes sales orgánicas e inorgánicas, aminoácidos y otros nutrientes. El conocimiento de la composición del jugo y la comprensión de sus propiedades químicas de sus componentes, son esenciales para el control y mejoramiento efectivo de los procesos de su extracción a partir de la caña de azúcar (Spencer, 1967). En el Cuadro 1 se presenta la composición química del jugo de caña, según Pedrosa (1975).

2.3 LAS POLIFENOLOXIDASAS (PFO)

Las enzimas denominadas genéricamente polifenoloxidasas (PFO) han sido sujeto de investigación desde la década de los 50 con la finalidad de caracterizarlas y evitar su actividad, beneficiando así la presentación de los productos (Dávila *et al.*, 2007).

Las polifenoloxidasas (PFO) son enzimas ubicuas en plantas que catalizan la reacción dependiente de oxígeno que transforma o-difenoles en o-quinonas. Estas quinonas son especies muy reactivas capaces de modificar covalentemente un amplio abanico de especies nucleófilas del interior de las células que conduce a la formación de polímeros marrones o negros responsables de importantes pérdidas económicas en el mercado de frutos y vegetales (Lee y Whitaker, 1995).

Las polifenoloxidasas (PFO) que se encuentran en las plantas son las responsables de las reacciones de pardeamiento enzimático que ocurren durante el almacenamiento, manipulación y procesamiento de frutas y vegetales. Las polifenoloxidasas, también conocidas como tirosinasas, fenoloxidasas, monofenoloxidasas o cresolasas, catalizan la hidroxilación de monofenoles a ortodifenoles, posteriormente oxidados a ortoquinonas, las cuales se polimerizan dando lugar a pigmentos que presentan color marrón, rojo o negro, dependiendo de los componentes naturales presentes en los tejidos vegetales. Estas reacciones modifican las características organolépticas y nutricionales del alimento, disminuyendo su calidad (McEvily *et al.*, 1992 y Matheis y Whitaker, 1984).

Cuadro 1: Composición Química del Jugo de Caña

Constituyentes	Porcentaje (%)
Agua	74,50
Cenizas	0,50
SiO ₂	0,25
K ₂ O	0,12
Na ₂ O	0,01
CaO	0,02
MgO	0,01
Fe ₂ O ₃	trazas
P ₂ O ₅	0,07
SO ₃	0,02
Fibras	10,00
Celulosa	5,50
Pentosa (xylán)	2,00
Goma de la Caña (Arobán)	0,50
Lignina, etc	2,00
Azúcares	14,00
Sacarosa	12,50
Dextrosa	0,90
Levulosa	0,60
Albuminóides	0,12
Amidos (asparagina)	0,07
Cuerpos Nitrogenados	0,40
Grasa y Cera	0,20
Pectinas (gomas)	0,20
Ácidos Libres (málico, succínico, etc)	0,08
Ácidos Combinados	0,12
Total	100,00

Fuente: Pedrosa (1975)

2.3.1 Categorización de la Polifenoloxidasas

Según el Comité de Nomenclatura Enzimática de la Unión Internacional de la Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB, 2005), la Polifenoloxidasas es catalogada como EC 1.10.3.1 donde:

- EC 1 Oxidoreductasas
- EC 1.10 Actuando sobre difenoles y sustancias relacionadas como donadores.
- EC 1.10.3 Corresponde "con oxígeno como aceptor"
- EC 1.10.3.1 Polifenoloxidasas o catecoloxidasas

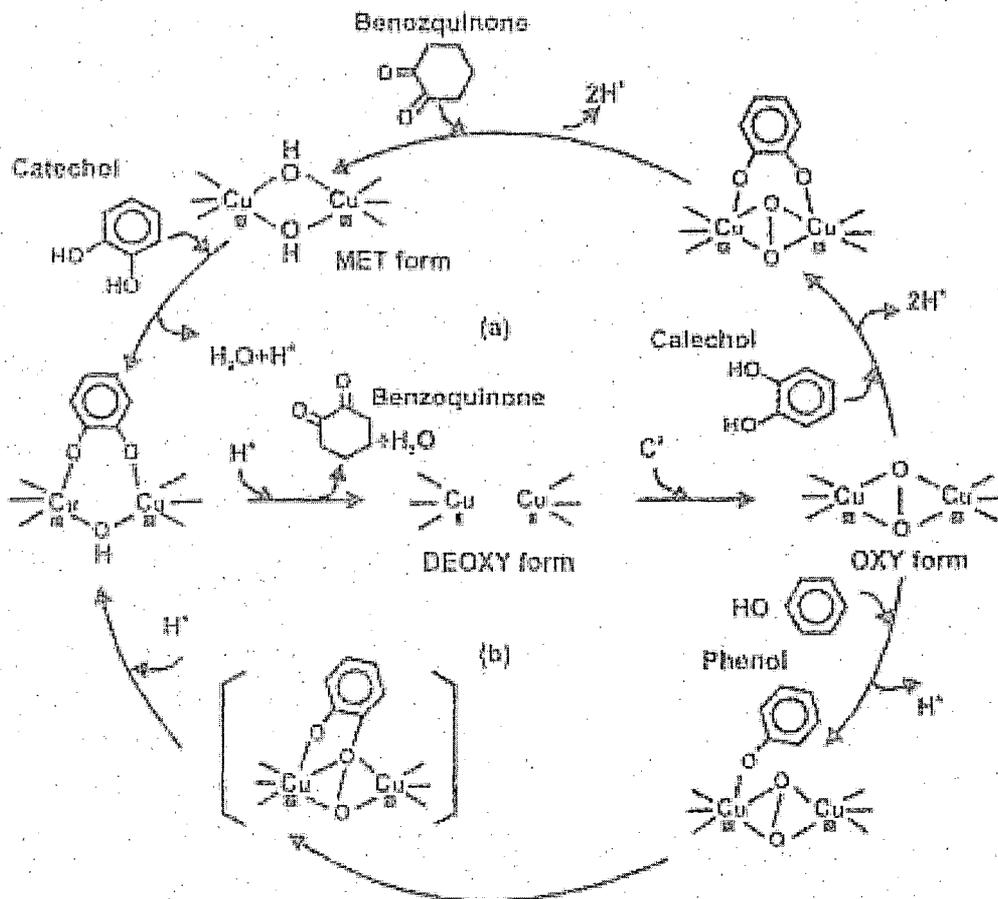
2.3.2 Mecanismo de Acción de la Polifenoloxidasas

La polifenoloxidasas es una proteína que contiene cobre como grupo prostético y a diferencia de la mayoría de las enzimas, puede catalizar dos tipos de reacciones diferentes (Whitaker, 1972). Estas reacciones incluyen la hidroxilación de monofenoles para producir o-difenoles y la remoción de hidrógenos de los o-difenoles para producir quinonas.

En la Figura 1, se muestra el mecanismo de reacción de la PPO, este se basa en la catálisis de dos etapas: oxidación de un monofenol a o-difenol y la subsiguiente oxidación de este a o-quinona, actividad cresolasa y catecolasa respectivamente. Siguiendo un mecanismo ordenado, la enzima liga primero el oxígeno y después el monofenol. Se produce un cambio de valencia de los iones de cobre de Cu^{1+} a Cu^{2+} formándose un complejo que tiene un enlace O - O bien polarizado donde se produce la hidroxilación a o-difenilo. La oxidación del o-difenol a o-quinona finaliza el ciclo (Belitz y Grosh 2004)

La polifenoloxidasas es capaz de catalizar reacciones de oxidación de compuestos polifenólicos en presencia de oxígeno molecular y la presencia de los compuestos oxidados por la enzima son precursores de las reacciones de pardeamiento que ocurren en los procesos de pos-recolección y manipulación de frutas y hortalizas.

La oxidación del catecol, empieza con la forma DEOXY en el centro de la figura y se mueve en sentido contrario a las agujas del reloj, por la mitad superior (a), luego vuelve a la forma DEOXY. Para la oxidación monofenólica, empieza con la forma DEOXY y se mueve en sentido de las agujas del reloj, por la mitad inferior. (Martínez y Whitaker, 1995)



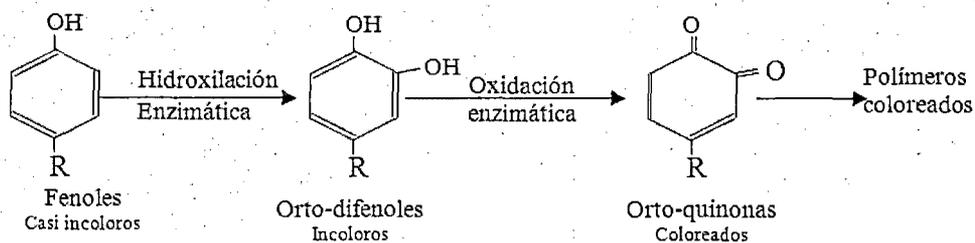
Fuente: Martinez y Whitaker (1995).

Figura 1. Mecanismo Cinético Propuesto Para la Oxidación de o-difenol (catecol (a) y un monofenol (fenol (b)).

2.4 PARDEAMIENTO ENZIMÁTICO

Cheftel y Cheftel (1992) denominan pardeamiento enzimático a la transformación enzimática en sus primeras etapas, de compuestos fenólicos en polímeros coloreados, frecuentemente pardos a negros. En la Figura 2 se muestra las fases de la transformación.

Gaillard y Forget (1997) definen al pardeamiento enzimático como una oxidación enzimática de componentes fenólicos endógenos por la polifenoloxidasas en presencia de oxígeno. El grado de pardeamiento depende del oxígeno y contenido de polifenoloxidasas.



Fuente: Cheftel y Cheftel (1992)

Figura 2. Transformación de Fenoles en Polímeros Coloreados

Para que se produzca el pardeamiento es necesario la presencia de los tres componentes: enzima, sustrato más el oxígeno. Como nada se puede hacer o muy poco con el sustrato oxidable, los métodos hoy en uso tienden a inhibir la enzima o a eliminar el oxígeno y algunas veces se combinan ambos métodos (Schmidt y Pennacchioti, 2001).

En banano (*Musa acuminata*) las reacciones de pardeamiento resultan de la oxidación enzimática de la dopamina (3,4 dihidroxi fenil etil amina) por la polifenoloxidasas, su máxima actividad se obtiene a un pH de 7.0. Esto significa que la dopamina es el sustrato más reactivo para la polifenoloxidasas en comparación con otros sustratos, como por ejemplo: la D y L dihidroxifenilalanina (dopa), catecol y ácido clorogénico los cuales presentan valores de constantes cinéticas, que varían desde 6.3×10^{-4} hasta 3×10^{-2} M (Palmer, 1961).

El control del pardeamiento enzimático durante el procesamiento y almacenamiento es importante para preservar la apariencia de las frutas y además es uno de los principales objetivos para el procesamiento de alimentos e investigaciones (Soliva-Fortuy *et al.*, 2004).

El control natural de la actividad de la polifenoloxidasas se produce fundamentalmente mediante la compartimentalización de los sustratos. La enzima se encuentra en los plástidos y cloroplastos (en los vegetales superiores), y también en el citoplasma celular, mientras que los compuestos fenólicos que pueden servir de sustratos se acumulan en vesículas. Cuando se rompe la compartimentalización por un daño mecánico como el triturado, corte o congelación y descongelación, se puede producir la reacción de pardeamiento. También se produce la inhibición de la enzima por los productos de la reacción. Además manteniendo la compartimentalización, la reacción de

pardeamiento se puede frenar actuando sobre diferentes factores: evitando el contacto del oxígeno con la superficie de corte, bajando la temperatura, reduciendo el pH, desnaturalizando la enzima, generalmente estos factores actúan de forma combinada (Calvo, 2007).

Özođlu y Bayindirli (2002), mencionan como agentes probados contra el pardeamiento enzimático al ácido ascórbico, ácido isoascorbico, α -cyclodextrina, L-cisteína, ácido benzoico, ácido cinámico y ácido sórbico, del mismo modo Scheel *et al.* (1969) citado por Schmidt y Pennacchiotti (2001) reportan al ácido ascórbico como el más recomendable para evitar o minimizar el pardeamiento enzimático, por su carácter vitamínico inofensivo. El ácido ascórbico por sí mismo no es un inhibidor de la enzima: actúa sobre el sustrato, de modo que puede adicionarse después de haberse formado las quinonas; tiene la propiedad de oxidarse a ácido dehi-hidroascórbico, reduciendo la quinona a fenol.

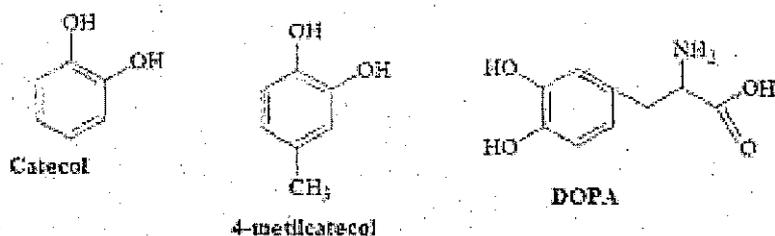
Productos especialmente propensos a empardecer por oxidación, como manzanas, peras, duraznos, damascos, ciruelas y plátanos entre las frutas, y papas, espárragos, zanahorias entre las hortalizas, deben mantenerse, inmediatamente después de cortadas o peladas, en agua adicionada de 0,1-0,2 % de ácido ascórbico y de 0,2% de ácido cítrico (Schmidt y Pennacchiotti, 2001).

2.5 INHIBICIÓN DE LA POLIFENOLOXIDASA (PFO)

No existen muchos estudios realizados en inhibición de polifenoloxidasas en jugo de caña. Siendo el banano uno de los más estudiados, los primeros estudios sobre la Polifenoloxidasas en banano los realizó Palmer (1961) para la United Fruit Co. En este trabajo plantea algunas propiedades de la Polifenoloxidasas y las compara con otras fuentes vegetales de esta enzima. A partir de este momento, se desprenden gran cantidad de investigaciones explorando la manera de como inhibir el pardeamiento, especialmente, en frutas y hortalizas. Palmer (1961) evaluó varios tipos de sustratos, para determinar la actividad enzimática en mono o difenoles, como por ejemplo dopamina, ácido clorogénico, catecol, dopa, entre otros, ver figura 3a y 3b.

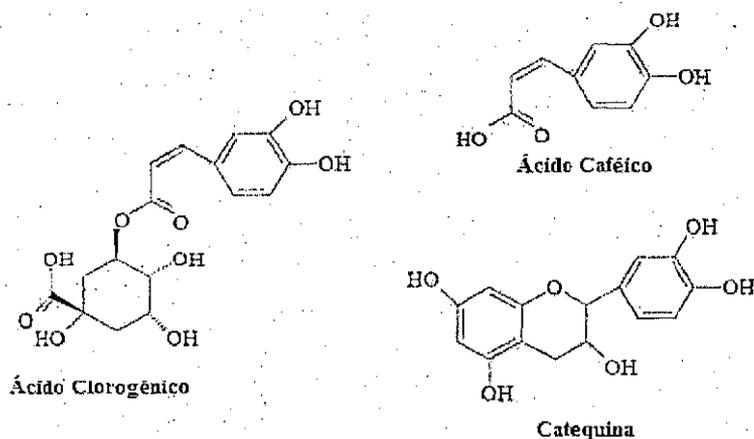
Para inactivar Polifenoloxidasas se han utilizado sustancias como ácido ascórbico, ácido cítrico, cloruro de sodio (Pizzocaro *et al.* 1993 y Lu *et al.* 2007), cisteína, 4-hexilresorcinol (Guerrero *et al.* 2004). Buscando otras alternativas se han usado sulfitos, tioles, cuminadehído (Kubo y Kinst-Hori, 1998), extractos vegetales y técnicas combinadas como atmosferas controladas, ácido ascórbico y EDTA (Soliva-Fortuny *et al.* 2002), adición de sustancias químicas (Klapp *et al.* 1990, Dawley y Flurkey, 1993), ajustando las condiciones de pH (Wesche-Ebeling y Montgomery, 1990), por exclusión de oxígeno, y aplicando métodos físicos como la refrigeración y procesos térmicos además de tecnologías emergentes como los campos eléctricos pulsados, altas presiones hidrostáticas, rayos Gamma Queiroz *et al.* (2008) y Oh *et al.*, (2005).

Los tratamientos por calor o frío para la inhibición de enzimas sino se realizan adecuadamente causan sobre las frutas y hortalizas efectos adversos tales como la pérdida de color, alteraciones en su sabor, olor y pérdida de su valor nutricional (Alzamora *et al.* 2004).



Fuente: Queiroz *et al.*(2008).

Figura 3a. Estructura de algunos sustratos naturales de la Polifenoloxidasas.



Fuente: Queiroz *et al.*(2008).

Figura 3b. Estructura de Algunos Sustratos Naturales de la Polifenoloxidasas.

Finalmente entre los métodos comerciales para inhibir la Polifenoloxidasa se tiene el tratamiento térmico, uso de sulfitos y de ácidos y la eliminación del oxígeno (Herrera *et al.*, 2003).

2.5.1 Inhibidores Enzimáticos de la Polifenoloxidasa

2.5.1.1 Agentes Reductores

Previenen el pardeamiento enzimático por la reducción de *o*-quinonas a *o*-difenoles no coloreados. Los compuestos derivados del azufre son los más ampliamente empleados en la industria de los alimentos. Ejemplo el bisulfito (HSO_3^-) y sulfitos (SO_3^{2-}) (Marshall *et al.*, 2000). En esta clasificación también se encuentra al ácido ascórbico y la cisteína, la cual tiene efectos negativos sobre el sabor (Amiot, 1997).

2.5.1.2 Acidulantes

Los acidulantes son aplicados generalmente para mantener el pH por debajo del punto óptimo de actividad catalítica de la enzima. Acidulantes como el ácido cítrico, málico y fosfórico pueden inhibir el efecto de la polifenoloxidasa. Los acidulantes son usados frecuentemente con otros antioxidantes.

2.5.1.3 Quelantes

Un Quelato es un compuesto de coordinación en el que un átomo, generalmente un metal, está unido mediante enlaces de coordinación a dos más átomos de una o más moléculas llamadas quelantes, secuestrantes. Tienen la peculiaridad de que el metal que contiene no desarrolla funciones catalíticas como lo podría hacer si estuviera libre o no quelado. Las enzimas generalmente poseen iones de metales en su sitio activo. Los agentes quelantes remueven estos iones inactivando a la enzima. Tanto los complejos formados entre los agentes quelantes y los prooxidantes tales como el cobre o el hierro, son inhibidores (Badui, 2006).

2.5.1.4 Agentes acomplejantes

La más importante propiedad funcional de la ciclodextrina como agente acomplejante es su habilidad para la inclusión de moléculas dentro del núcleo hidrofóbico

o ligeramente apolar, convirtiéndose en un excelente inhibidor de pardeamiento en frutas frescas y vegetales crudos. Una gran variedad de compuestos naturales y sintéticos, tienen la capacidad de unirse reversible e irreversiblemente a enzimas específicas y alterar su actividad. Los inhibidores competitivos, no competitivos e incompetitivos son reversibles (Otwell *et al.*, 1992).

2.5.1.5 Inhibidores de enzimas

El 4-hexilresorcinol, es un compuesto *m*-difenólico que está estructuralmente relacionado con los sustratos fenólicos, tiene un efecto inhibitorio competitivo con la Polifenoloxidasasa (Otwell *et al.*, 1992 y Mc-Evily *et al.*, 1992). La actividad de la monofenolasa y difenolasa de la tirosinasa son inhibidas por el 4-HR. Este es efectivo a bajas concentraciones, tiene estabilidad química, y presenta alto sinergismo con el ácido ascórbico mientras reduce las quinonas (Guerrero *et al.*, 2004).

Entre las investigaciones realizadas respecto al uso de inhibidores enzimáticos de la polifenoloxidasasa, Rivas (1997) evaluó el efecto del NaCl, ácido ascórbico y metabisulfito de sodio sobre la actividad de la enzima polifenoloxidasasa en cambur manzano. Los dos últimos inhibidores, además de causar una disminución en la actividad de la enzima, provocaron un retardo en el inicio de la reacción. El ácido ascórbico a una concentración 4×10^{-4} M produjo un 77,3% de disminución en la actividad de la polifenoloxidasasa. Por su parte, el metabisulfito de sodio, a una concentración de $2,66 \times 10^{-4}$ M inhibió un 63,7% de la actividad. Esto significa que las dos sustancias son buenos inhibidores de la enzima. El NaCl por el contrario no es tan efectivo, pues se requirió una concentración de 5% para reducir la actividad de la enzima en un 50%.

Veliz (2004) realizó el control del pardeamiento enzimático de la alcachofa mediante la tecnología de factores combinados, utilizando como factores de estudio ácido ascórbico en solución a dos concentraciones 0,75% y 0,9% con valores de pH 5,0 y 4,5, dos temperaturas 2°C y 18°C (ambiente), para alcachofa en trozos (cubos), fondos y pulpa. Se realizó una evaluación sensorial a los 15, 30 y 60 minutos a las 24 y 48 horas y luego una evaluación de formación de color a lo largo del tiempo mediante un espectrofotómetro, primero cada media hora hasta las cuatro horas y luego a las 8, 12 y 16 horas. El propósito fue observar la tendencia del pardeamiento a lo largo del tiempo. Se determinó que con la

solución de 0,9% de ácido ascórbico, 4,5 de pH y temperatura de 2°C se retardaba mas la formación del color pardo pero no se daba la inhibición completa del oscurecimiento, tanto para trozos como para fondos, por lo que se sugiere agregar un factor más de control que pudiera ser el envasado en atmósfera modificada o al vacío, forma de envasado que es bastante utilizado en la tecnología del mínimo proceso.

2.5.2 Inhibición de la Polifenoloxidasas por Acción del Calor

La polifenoloxidasas puede ser inactivada en forma efectiva por acción del calor, la intensidad del calentamiento para inactivar las enzimas depende de muchos factores ya que cada uno tiene una determinada termosensibilidad. El calentamiento produce cambios en el alimento; si se aplica un tratamiento térmico suficiente, se recomienda utilizar temperaturas de 70 a 90°C durante corto tiempo para inactivar esta enzima (Badui, 2006).

Paredes *et al.* (2003) establecieron que el tratamiento térmico para obtener la menor actividad enzimática residual de polifenoloxidasas (PFO) en jugo de caña fue de 80°C por 4 minutos, permitiendo obtener un producto con características organolépticas apropiadas.

Lee *et al.* (1988) establecieron la inactivación de polifenoloxidasas, catalasa y lipoxigenasa en habas verdes a condiciones de temperatura de 82°C por un tiempo de 3.5 minutos. Asimismo la exposición de la polifenoloxidasas a temperaturas en el rango de 70°C a 90°C, da lugar a la destrucción de su actividad catalítica (Vámos-Vigyázó, 1981).

Gasull y Becerra (2006) estudiaron las características de la polifenoloxidasas extraída de peras *Packam's Triumph* y manzanas *Red Delicious* y establecieron que el pH y la temperatura óptimos fueron respectivamente 6,5 y 25°C para pera, 7 y 30°C para manzana, utilizando 50 mM de catecol en buffer fosfato como sustrato. Asimismo realizaron estudios cinéticos y encontrando que la inactivación térmica de PFO sigue una cinética de primer orden.

Diaz *et al.* (1995) reportan que la actividad de la polifenoloxidasas del jugo de manzana decrece cuando el pH desciende a valores menores de 6.5 y se inactiva totalmente cuando el pH se encuentra entre 2 y 2,5. Asimismo Gauillard y Forget (1997) , encontraron

a través de mediciones isoléctricas de polifenoloxidasa en pera, la presencia de isoenzimas para valores pico a pH 4,2 y 4,5, otros picos menores a pH 3,4 y 5,4.

2.6. ÁCIDO ASCÓRBICO

El ácido ascórbico como antioxidante es uno de los aditivos más utilizados en la industria de los alimentos como conservante y principalmente como inhibidor de pardeamiento.

Una de sus grandes desventajas es su inestabilidad a altas temperaturas, la luz y la concentración que incrementan la velocidad de degradación de éste a ácido dehidroascórbico. El ácido ascórbico confiere una protección temporal ya que es oxidado a ácido dehidroascórbico en el proceso de pardeamiento, permitiendo que la quinona se acumule y tenga un efecto contrario (Laurila y Ahvenainen, 2002).

Los procesos de pardeamiento suceden de manera lenta a partir de la degradación del ácido ascórbico, pero cuando se forma el DHAA la reacción se acelera. Se han identificado dos compuestos de degradación como son: 3,4-dihidroxi-5-metil-2-(5H)-furanona y el ácido 2-furanocarboxílico (Sawamura *et al.*, 2000).

El efecto del ácido ascórbico, bisulfito de sodio, y otros reactivos en la reducción de la polifenoloxidasa ha sido polémico en los últimos años. El efecto del sulfito y ácido ascórbico han sido más estudiados debido a su amplio uso en la industria de alimentos. Los primeros informes indican que el ácido ascórbico no tuvo efecto directo sobre la actividad de la polifenoloxidasa. Varoquaux y Sarris (1979), sugirieron que el ácido ascórbico no inhibe ni activa la enzima. Sin embargo, varios investigadores, reportan la inactivación de la enzima por el ácido ascórbico (Pizzocaro *et al.*, 1993). Últimos estudios demuestran que la acción del ácido ascórbico en la inhibición del pardeamiento es debido a que actúa sobre las quinonas reduciéndolas a o-difenoles no coloreados que son compuestos más estables (Marshall *et al.*, 2000)

Los tratamientos para inhibir el pardeamiento enzimático utilizan el ácido ascórbico o sus isómeros como el ácido eritórbico (d-ácido isoascórbico), ácido cítrico, EDTA,

cisteína, y sus derivados. Trabajos recientes presentan al 4-hexilresorcionol como un buen agente inhibidor de pardeamiento en frutas; sin embargo solo ha sido aprobado para prevenir la decoloración en camarones (Guerrero *et al.*, 2004 y Mc-Evily *et al.*, 1992).

2.7. METODOLOGÍA DE SUPERFICIE RESPUESTA

La Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) es un conjunto de técnicas matemáticas utilizadas en el tratamiento de problemas en los que una respuesta de interés está influida por varios factores de carácter cuantitativo. El propósito inicial de estas técnicas es diseñar un experimento que proporcione valores razonables de la variable respuesta y, a continuación, determinar el modelo matemático que mejor se ajusta a los datos obtenidos. El objetivo final es establecer los valores de los factores que optimizan el valor de la variable respuesta. Por lo tanto la metodología de superficies de respuestas (MSR) es una técnica estadística que permite la optimización de una respuesta determinada considerando todos los factores que influyen directamente sobre esta (Reyes *et al.*, 2005).

Asimismo Ayala y Pardo (1995) definen a la metodología de superficie respuesta como un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas utilizadas para modelar y analizar problemas en los que una variable de interés es influenciada por otras. El objetivo es optimizar la variable de interés o variable respuesta. Esto se logra al determinar las condiciones óptimas de operación del sistema.

La optimización mediante superficies de respuesta le permite al tecnólogo de alimentos minimizar los costos, maximizar las ganancias, reducir el empleo de ingredientes o preservantes costosos, incrementar las características deseables del alimento sin comprometer su inocuidad durante el desarrollo de un nuevo producto o para el mejoramiento de uno existente (Reyes *et al.*, 2005).

La optimización de un proceso por medio de diseños experimentales requiere del uso de una metodología o estrategia adecuada, que nos lleve por el camino seguro y rápido para encontrar los valores óptimos de un proceso bajo estudio (Elías *et al.*, 2006).

En la mayoría de los problemas de superficie de respuesta, la forma de la relación entre la respuesta y las variables independientes es desconocida. Por lo tanto, el primer paso en la metodología de superficie de respuesta es encontrar una aproximación adecuada de la verdadera relación funcional entre “y” y el conjunto de variables independientes. Por lo general se emplea un polinomio de orden inferior en alguna región de las variables independientes. Si la respuesta está bien modelada por una función lineal de las variables independientes, entonces la función de aproximación es el modelo de primer orden (α) (Montgomery, 1991).

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_k x_k + \varepsilon \dots\dots\dots (\alpha)$$

Los parámetros del modelo se estiman mediante el método de los mínimos cuadrados ordinarios. Una vez que se tienen los estimadores se sustituyen en la ecuación y se obtienen el modelo ajustado (β) (Cornell, 1990).

$$\hat{Y} = b_0 + b_1 x_1 + b_2 x_2 + \dots + b_k x_k \dots\dots\dots (\beta)$$

Este modelo se utiliza cuando se quiere estudiar el comportamiento de la variable de respuesta únicamente en la región y cuando no conocemos la forma de superficie.

En el caso de que el modelo de primer orden no sea adecuado, se puede utilizar el modelo de segundo orden (δ).

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j}^k \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \dots\dots\dots (\delta)$$

Donde los β_i son los coeficientes de regresión para los términos de primer orden, los β_{ii} son los coeficientes para los términos cuadráticos puros los, los β_{ij} son los coeficientes para los términos de un producto cruz y ε es el término del error aleatorio. Los términos cuadráticos puros y los de producto cruz son de segundo orden. El número de términos en la ecuación está dado por $p = (k + 1)(k + 2) / 2$.

Los parámetros del modelo se estiman mediante el método de mínimos cuadrados. Una vez que se tienen los estimadores se sustituyen en la ecuación (δ) y se obtiene el modelo ajustado con el valor óptimo de la respuesta (Cornell, 1990).

$$\hat{Y} = b_0 + \sum_{i=1}^k b_i x_i + \sum_{i=1}^k b_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j}^k b_{ij} x_i x_j \dots\dots\dots (\gamma)$$

La significancia de los coeficientes estimados y el ajuste del modelo se prueban con el estadístico F. Una vez que se ha verificado que el modelo tiene suficiencia de ajuste y que los coeficientes son significativos, se procede a localizar las coordenadas del “punto estacionario” y se lleva a cabo el análisis detallado del sistema respuesta (Cornell, 1990).

2.8 NATURALEZA SECUENCIAL DE LA METODOLOGÍA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA

La MSR es una técnica secuencial. A menudo, la estimación inicial de las condiciones óptimas de operación está alejada del óptimo real, así que el objetivo es, usando un método lo más simple y menos costoso posible, moverse rápidamente hacia las cercanías del óptimo (Gutiérrez y De La Vara, 2008).

En general, se sabe muy poco o nada acerca de la relación existente entre la variable respuesta y los factores, así que, en un principio, se propone el modelo de aproximación más simple posible, el de primer orden, que suministra la base para ejecutar un conjunto inicial de experimentos que proporcionarán datos correspondientes a los puntos del diseño de primer orden. Si los datos recogidos permiten hacer una estimación de la varianza del error, se puede llevar a cabo un contraste para evaluar el ajuste del modelo. Esto conlleva a una segunda etapa, que consiste en localizar áreas de la región experimental en las que se sospeche que puedan estar los valores más deseables de la variable respuesta. El plan que se seguirá, permitirá valores máximos en la respuesta, y de ello se conoce como método de máxima pendiente en ascenso (en descenso si lo que se desea es minimizar los valores de la respuesta) (Gutiérrez y De La Vara, 2008).

2.8.1 Método de Máxima Pendiente en Ascenso

El método de máxima pendiente en ascenso consiste en ejecutar una secuencia de experimentos a lo largo de la línea de máximo incremento de la respuesta. Si el modelo ajustado de primer orden es adecuado, la información que éste proporciona se utiliza para determinar una dirección en la cual se espere observar mayores valores de la variable respuesta. A medida que se avanza sobre la superficie ajustada en la dirección en que se

incrementan los valores de la respuesta y se va llegando a una región en la que haya curvatura en la superficie real, el incremento en la respuesta se estabilizará en el punto más alto de la superficie ajustada. Si se continúa en esta dirección y la altura de la superficie disminuye, se lleva a cabo un nuevo conjunto de experimentos y se ajusta de nuevo el modelo de primer orden. Se determina una nueva dirección hacia valores crecientes de la respuesta y se ejecuta otra secuencia de experimentos en la dirección determinada. Este proceso continúa hasta que se hace evidente que a partir del método no se puede obtener un incremento en la respuesta o éste es muy pequeño (Gutiérrez y De La Vara, 2008).

Si los test de ajuste detectan que puede haber curvatura en la superficie, se aumenta un grado al modelo añadiéndole los términos del producto cruzado y/o los términos cuadráticos puros y se completa el diseño de primer orden añadiéndole los puntos necesarios para ajustar el nuevo modelo de segundo orden. Si el modelo de segundo orden se ajusta adecuadamente, se utiliza para describir la forma de la superficie a través de la gráfica de contornos en la región experimental. El modelo ajustado de segundo orden se utiliza para localizar, en el lugar en el que la pendiente de la superficie ajustada es cero, las coordenadas del punto estacionario, que es el punto que proporciona el valor óptimo de la variable respuesta y, si se detecta que éste se encuentra dentro de los límites de la región experimental, se pasa a determinar su naturaleza (si es máximo, mínimo o punto de silla). Si, por el contrario, el punto estacionario no se halla dentro de la región experimental, se debe de realizar una nueva experimentación en la dirección en la que éste se encuentra. Una vez que se ha localizado el punto que proporciona valores óptimos de la variable respuesta, se describe la superficie en un entorno próximo a éste (Gutiérrez y De La Vara, 2008).

2.9 DISEÑOS EXPERIMENTALES PARA AJUSTAR SUPERFICIES DE RESPUESTA

El ajuste y análisis de una superficie de respuesta se facilita con la elección apropiada de un diseño experimental. Un diseño es el conjunto específico de combinaciones de los niveles de las k variables que se utilizará al llevar a cabo el experimento (Ayala y Pardo, 1995).

2.9.1 Diseños para ajustar modelos de primer orden

Una clase única de diseños experimentales que minimizan la varianza de los coeficientes de regresión $(\hat{\beta}_i)$ son los diseños ortogonales de primer orden. Por ortogonal se entiende que los elementos fuera de la diagonal de la matriz $(x'x)$ son iguales a cero, lo cual implica que los productos cruzados de las columnas de la matriz x es igual a cero. (Montgomery, 2006).

En esta clase de diseños ortogonales de primer orden tenemos:

- Diseños factoriales 2^k
- Fraccionales de la serie 2^k
- Diseños simplex
- Diseños Plackett - Burman

2.9.2 Diseños para ajustar modelos de segundo orden

Un diseño experimental para ajustar un modelo de segundo orden debe tener al menos tres niveles de cada factor (-1, 0, +1). Así como el diseño de primer orden se desea la ortogonalidad, en éste se desea que sea un diseño rotatable. Se dice que un diseño es rotatable cuando la varianza de la respuesta predicha en algún punto es función solo de la distancia del punto al centro y no es una función de la dirección (Montgomery, 2006).

La rotabilidad es una propiedad importante, dado que la finalidad de la metodología de superficie de respuesta es optimizar y desconocemos la localización del óptimo, tiene sentido utilizar un diseño que proporcione estimaciones precisas en todas las direcciones. (Montgomery, 2006).

Dentro de los diseños rotatables de segundo orden se incluyen:

- Diseño central compuesto
- Diseño equirradial
- Diseño Box-Behnken

Existen varios criterios que se pueden tomar en cuenta para seleccionar un diseño de segundo orden, entre los que destacan:

- Que tenga un número mínimo de tratamientos y que permita estimar todos los parámetros del modelo de segundo orden.
- Que sea flexible en el sentido de que se pueda construir a partir de diseños de primer orden.
- Que tenga buenas propiedades como ortogonalidad, rotabilidad y/o precisión uniforme, que tienen que ver con la calidad de estimación del diseño.

En cuanto a economía, el diseño 3^k no compite con los de Box Behnken y con el diseño central compuesto, excepto cuando se tienen dos factores. El diseño central compuesto es el más flexible y se puede construir de manera que cumpla alguna o varias propiedades deseables. El diseño de Box Behnken es una buena alternativa, porque tiene un número competitivo de tratamientos, además de que por su construcción los puntos de prueba no son extremos, en el sentido de que cualquiera de ellos siempre tiene al menos uno de los factores en su nivel intermedio (Gutiérrez y De La Vara, 2008).

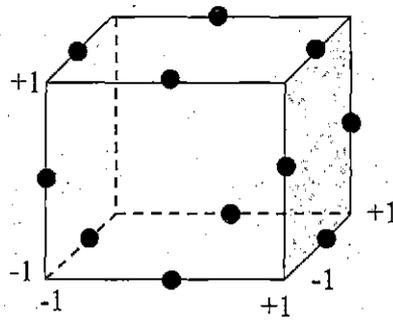
2.9.3 Diseño Box-Behnken

Box y Behnken han propuesto algunos diseños de tres niveles para ajustar superficies de respuesta. Estos diseños se forman combinando Factoriales 2^k con diseños de bloques incompletos. Los diseños resultantes suelen ser muy eficientes en términos del número de corridas, y son rotables o casi rotables (Mongomery, 2006)

El diseño de Box-Behnken se ilustra geoméricamente en la Figura 4, en la cual se observa que el diseño de Box-Behnken es un diseño esférico, con todos los puntos localizados en una esfera de radio $\sqrt{2}$. Asimismo, el diseño de Box – Behnken no contiene ningún punto en los vértices de la región cúbica creada por los límites superior e inferior de cada variable.

En el Cuadro 2 se muestra la combinación de los niveles superior, medio e inferior de cada variable en las 15 corridas que lo componen.

Esto podría ser una ventaja cuando los puntos de los vértices del cubo (Figura 4) representan combinaciones de los niveles de los factores cuya prueba es prohibitivamente costosa o imposible debido a restricciones físicas del proceso.



Fuente: (Montgomery, 2006)

Figura 4. Diseño de Box- Behnken para tres factores

Cuadro 2. Diseño de Box-Benken para tres variables

Corrida	X_1	X_2	X_3
1	-1	-1	0
2	-1	1	0
3	1	-1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	-1	0	1
7	1	0	-1
8	1	0	1
9	0	-1	-1
10	0	-1	1
11	0	1	-1
12	0	1	1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

Fuente: Montgomery (2006)

2.10 TÉCNICAS DE OPTIMIZACIÓN

Una vez que se tiene el modelo debidamente ajustado y validado se procede a explorar la superficie descrita por el modelo para encontrar la combinación de niveles en los factores que den por resultado un valor óptimo de la respuesta, o bien para determinar la dirección óptima de movimiento en la que se debe experimentar en el futuro. Si el modelo no explica un mínimo de 70% del comportamiento de la respuesta, en términos del R^2_{aj} no se recomienda utilizarlo para fines de optimización, porque su calidad de predicción es mala (Gutiérrez y De La Vara, 2008).

Si la superficie ajustada es un plano (modelo de primer orden), el objetivo del experimento trasciende la actual región experimental y se busca explorar una nueva región. Si la superficie es curva (modelo de segundo orden) el objetivo es determinar el punto óptimo, si éste existe y se encuentra dentro de la región experimental; si se encuentra afuera o no existe, se determina el mejor punto de operación posible adentro de la región experimental. Así, cuando existe curvatura en la superficie no se puede mover el proceso demasiado lejos de la actual región experimental, por eso se intenta obtener el mejor resultado posible con el actual diseño (Gutiérrez y De La Vara, 2008).

La técnica de optimización a utilizar depende del tipo de modelo ajustado y existen básicamente tres métodos: escalamiento ascendente o descendente, para modelo de primer orden, análisis canónico y el análisis de cordillera para el modelo de segundo orden (Gutiérrez y De La Vara, 2008).

2.11 EVALUACIÓN SENSORIAL

La evaluación sensorial de los alimentos se constituye en la actualidad como una de las herramientas más importantes para el logro del mejor desenvolvimiento de las actividades de la industria alimentaria (Ureña *et al.*, 1999). Las industrias de alimentos necesitan saber cómo hacer un producto aceptable al mercado, qué es lo que motiva al consumidor. La actitud que tiene está relacionada a factores sensoriales: apariencia, olor, sabor, aroma, viscosidad y como interactúan entre estas (Daget, 1983; citado por Milacatl, 2003).

La evaluación sensorial ha tomado campo notablemente y se ha comenzado a reconocer como disciplina en la ciencia de los alimentos y consumidores desde la mitad del siglo pasado. Comprende una serie de técnicas para medir de manera exacta y precisa la respuesta del consumidor hacia los alimentos y minimizar cualquier tipo de información que pueda influir en su percepción (Lawless y Heymann, 1999; citado por Milacatl, 2003). Es un método científico que se utiliza para provocar, medir, analizar e interpretar reacciones que producen las características de un producto o alimento tal y como se perciben por los sentidos de la vista, olfato, tacto, gusto y oído (Stone y Sidel, 1993; citado por Milacatl, 2003).

Está constituida por dos procesos definidos según su función: el análisis sensorial y el análisis estadístico. Mediante el primero se obtienen las apreciaciones de los jueces o panelistas a manera de datos que serán posteriormente transformados y valorados por el segundo, dándoles con ello la objetividad deseada (Ureña *et al.*, 1999).

El análisis sensorial puede ser definido como el método experimental mediante el cual los panelistas perciben y califican, caracterizando y/o midiendo, las propiedades sensoriales de muestras adecuadamente presentadas, bajo condiciones ambientales preestablecidas y bajo un patrón de evaluación acorde al posterior análisis estadístico.

Por otro lado el análisis estadístico está dado por la formulación de supuestos teóricos (hipótesis), con los que se podrá hacer inferencias o conclusiones sobre una población de alimentos o personas, y que serán comprobados a partir de los resultados del tratamiento estadístico de los datos obtenidos del análisis sensorial de la muestra que le represente; tratamiento aplicado en base a un adecuado diseño experimental que asegure la confiabilidad de los datos y sus resultados (Ureña *et al.*, 1999).

Así pues, los diseños experimentales están referidos solo a la secuencia particular en la cual un conjunto de muestras es presentado a una población específica de panelistas, mientras que el análisis estadístico lo está a las operaciones matemáticas específicas aplicadas a los datos obtenidos del análisis sensorial (Ureña *et al.*, 1999).

2.11.1 Campo de aplicación de la Evaluación Sensorial

La industria de alimentos reconoce la importancia de la evaluación sensorial al considerarla como un instrumento clave para la selección de nuevos productos, el

desarrollo de productos y el control de calidad de los mismos. Además la evaluación sensorial comprende la determinación de todas las propiedades que caracterizan un producto; por esta razón se necesita no solamente análisis físicos, químicos y bacteriológicos, sino también una evaluación sensorial (Ruth Dos Santos 1985 mencionado por Rosas, 2001).

La evaluación sensorial de los alimentos se constituye en la actualidad como una de las más importantes herramientas para el logro del mejor desenvolvimiento de las actividades de las actividades de la industria alimentaria. Por su aplicación en el control de calidad y de procesos, en el diseño y desarrollo de nuevos productos y en la estrategia del lanzamiento de los mismos al comercio, la hace, sin duda alguna, la coparticipe del desarrollo (Ruth Dos Santos, 1985 mencionado por Rosas, 2001).

Según Watts *et al.* (1992), la información sobre los gustos y aversiones, preferencias y requisitos de aceptabilidad de productos, se obtiene empleando métodos de análisis adaptados a las necesidades del consumidor y evaluaciones sensoriales con jueces no entrenados.

2.11.2 Clasificación de las Pruebas Sensoriales

Las pruebas sensoriales pueden clasificarse en pruebas afectivas orientadas al consumidor y pruebas analíticas orientadas al producto. Las pruebas afectivas son aquellas en la que el juez expresa su reacción subjetiva ante el producto, indicando si le gusta o le disgusta, si lo acepta o lo rechaza (Larmond 1977 citado por Anzaldúa-Morales 1994).

Amerine *et al.* (1965), sostiene que las pruebas afectivas, son las más difíciles de interpretar y son las que presentan mayor variabilidad en los resultados. Las pruebas afectivas incluyen las pruebas de preferencia, pruebas de aceptabilidad y pruebas del grado de satisfacción.

Witting de Penna (1981), menciona que el objetivo de los estudios de preferencia del consumidor son: determinar el mercado potencial, controlar la calidad de productos existentes y determinar las características específicas que interesan al consumidor. Asimismo indica que existen factores que pueden influir en los resultados de los test de los consumidores. Factores tales como :población muestreada, cantidad de muestra que se

entrega, método de muestreo, cantidad de repeticiones, tamaño del error estadístico, interpretación de los resultados, las consideraciones psicológicas, cuestionarios y la hora de degustación.

En las pruebas con consumidores no se emplean jueces entrenados ni seleccionados por su agudeza sensorial. Sin embargo, los jueces deben ser usuarios del producto, se debe seleccionar una muestra aleatoria numerosa, compuesta de personas representativas de la población de posibles usuarios, con el fin de obtener información sobre las actitudes o preferencias del consumidor (Watts *et al.*, 1992).

Respecto a la cantidad de jueces necesarios para llevar a cabo este tipo de pruebas no hay un acuerdo unánime, Watts *et al.* (1992) mencionan que por lo general para este tipo de pruebas se entrevistan de 100 a 500 personas. Sin embargo, Ellis (1961) y ASTM (1968) mencionados por Anzaldúa-Morales (1994) reportan que el número mínimo de jueces tipo consumidor debe estar conformado por 30 personas, mientras Amerine *et al.* (1965); Larmond (1977) y Anzaldúa-Morales (1994), indican que es preferible contar con 40 jueces para cada muestra.

Para seleccionar a los jueces consumidores se emplean entrevistas o pruebas que pueden realizarse en un lugar central tal como un mercado, una escuela, un centro comercial o un centro comunitario, o también en los hogares de los consumidores. Debido a que este proceso es caro y requiere bastante tiempo, frecuentemente se utilizan paneles internos de consumidores en la etapa inicial de los estudios de aceptabilidad de un producto (Watts *et al.*, 1992).

Okayasu y Naito (2001), evaluaron las características sensoriales de jugo de manzana mediante consumidores y panelistas entrenados. El panel estuvo conformado por 140 consumidores y 10 panelistas entrenados, esta investigación tuvo como objetivos estudiar la preferencia de los consumidores, obtener las características sensoriales mediante un panel entrenado y la relación entre la preferencia de los consumidores y los atributos del panel entrenado. Se estudiaron las relaciones de interdependencia de las características sensoriales mediante Análisis de Componentes Principales (ACP).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LUGAR DE EJECUCIÓN

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Química y Biología de la Universidad Católica Santo Toribio de Mogrovejo. Chiclayo. Lambayeque.

3.2 MATERIA PRIMA

Se utilizó caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) Variedad H 32, proveniente del distrito de Pomalca de la provincia de Chiclayo. Lambayeque.

3.3 MATERIALES

- Termómetro de mercurio (0 – 120°C).
- Recipiente de acero inoxidable
- Vasos de Precipitación Pirex de 100 y 500ml
- Pipetas volumétricas de 0,5, 1 y 10ml
- Varillas de agitación
- Tubos de ensayo Pirex
- Gradillas.
- Matraz Erlenmeyer Pirex de 50, 250 ml.
- Embudo de filtración
- Tubos espectrofotométricos
- Buretas
- Probetas de 10 y 100ml
- Pinzas de Soporte universal
- Soporte Universal
- Mechero Bunsen
- Papel Whatman No. 1

3.4 EQUIPOS

- Espectrofotómetro GENESYS serie 10 UV
- Baño termostático. Memmert
- Potenciómetro. Hanna
- Refractómetro. HRNB-32 ATC escala 0 - 32 brix
- Balanza. Boeco
- Refrigeradora. Bosch Intelligent
- Estufa Memmert
- Centrifuga Hettich Rotofix 32
- Trapiche.

3.5 REACTIVOS

- Ácido ascórbico grado alimentario.
- Solución de catecol 0,1M
- Solución de buffer fosfato 0,2M
- Agua destilada
- Hidróxido de sodio 0.1N
- Fenoltaleína
- Hipoclorito de Sodio al 6.25% marca Clorox

3.6 MÉTODOS DE ANÁLISIS

3.6.1 Análisis Físico Químicos

- Acidez titulable total. Método de la A.O.A.C. (1995).
- Determinación del pH. Método de la A.O.A.C. (1995).
- Sólidos Solubles. Método de la A.O.A.C. (1995).
- Determinación de azúcares reductores. NTP 2007-12-01 022:2005 (INDECOPI, 2005).

3.6.2 Evaluación Sensorial

En la evaluación sensorial se utilizó la metodología recomendada por Costell y Duran (1981a y b), mostrada en la Figura 5 y descrita a continuación.

3.6.2.1 Planteamiento

El objetivo al aplicar las pruebas sensoriales fue determinar el grado de satisfacción del jugo de caña que corresponde al tratamiento optimizado en comparación con el jugo sin tratamiento.

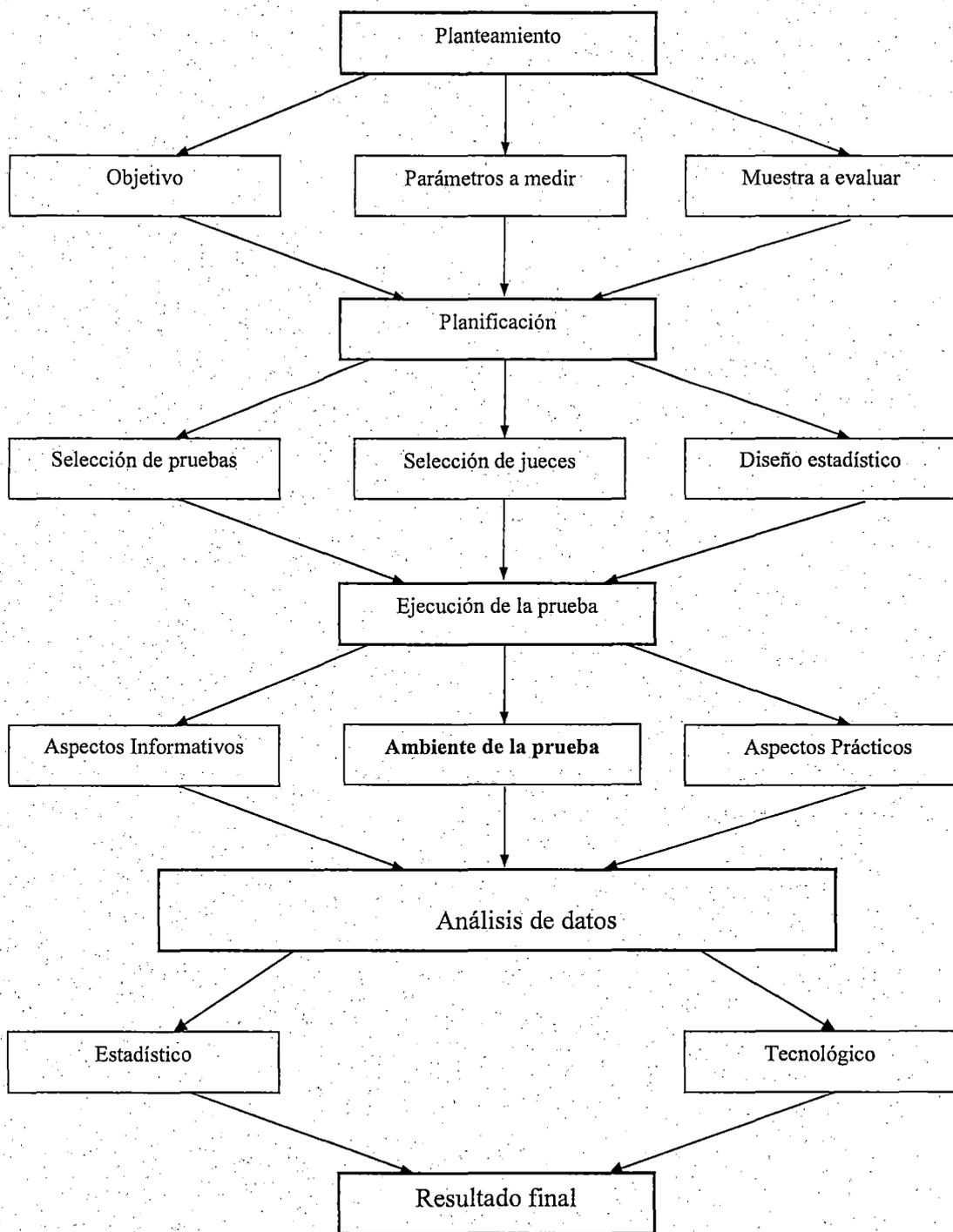
En cuanto a las muestras, la cantidad entregada de cada tratamiento fue de 50 ml (Ureña *et al.*, 1999). La presentación fue en vasos de plástico transparente sin tapa y codificadas con números de tres dígitos (sin repetición por muestra), además de vaso con agua de mesa sin gas como vehículo de limpieza bucal (Anzaldúa-Morales, 1994).

3.6.2.2 Planificación

La selección de pruebas generó el uso de: la prueba de grado de satisfacción (Anzaldúa-Morales, 1994) para evaluar el nivel de aceptación del tratamiento óptimo, en cuanto al sabor, color y aceptabilidad general, se empleó una escala hedónica de 5 niveles

- 1: Me desagrada Mucho
- 2: Me desagrada
- 3: No me agrada ni me desagrada
- 4: Me agrada
- 5: Me agrada mucho

Para la selección de panelistas, la prueba afectiva empleada no requiere de panelistas entrenados, por lo tanto se emplearon como panelistas, alumnos consumidores de jugo de caña de azúcar, seleccionados del nivel de pregrado de la Universidad Católica Santo Toribio de Mogrovejo de Chiclayo. Lambayeque. Según lo recomendado por Zook y Wessman (1977) se empleó una encuesta de preselección, a partir de ella se conformó un grupo de edades entre 18 y 25 años integrado por personas de ambos sexos, 100 en total.



Fuente: Costell y Durán (1981a)

Figura 5. Metodología General del Análisis Sensorial

3.6.2.3 Realización

En los aspectos ambientales, informativos y prácticos, según Costell y Duran (1982) las condiciones de evaluación fueron lo más parecidas a las que rodean a los consumidores grupo objetivo de la investigación para estudios de preferencia o aceptación. Las pruebas sensoriales se desarrollaron en las instalaciones de la Universidad, en áreas libre de olores extraños y ruido fuerte. Asimismo dichos consumidores recibieron las indicaciones para facilitar la evaluación.

3.6.3 Análisis de a Inactivación Térmica

- La extracción de la enzima Polifenoloxidasa fue de acuerdo al Método de Potig y Joslyn citado por Paredes *et al.* (2003).
- La inactivación de Polifenoloxidasa fue determinado mediante la metodología usada por Özođlu y Bayindirli (2002).

3.7. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Para cumplir con los objetivos planteados en esta investigación el trabajo se realizó en 4 etapas tal como se muestra en la Figura 6.

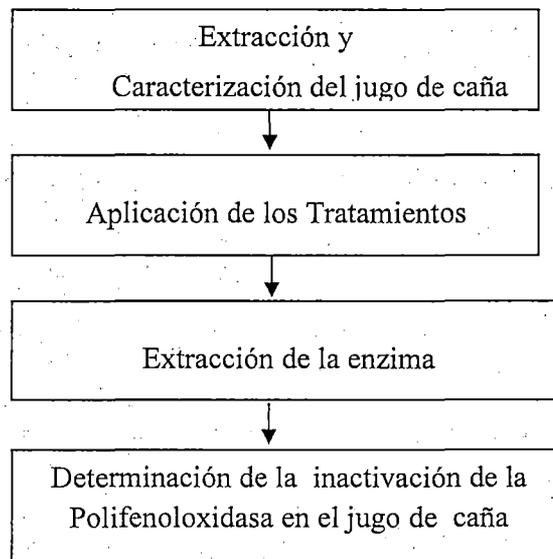


Figura 6. Etapas de la Metodología Experimental

Las etapas de la metodología experimental se describen a continuación.

3.7.1 Primera Etapa. Extracción y caracterización del jugo de caña.

La caña variedad H 32 provino del mismo campo de las plantaciones de la Agroindustrias Pomalca S.A para evitar interferencias en los resultados. La caña fue lavada con agua potable con la finalidad de remover la suciedad, tierra y otras sustancias adheridas a la caña, después las cañas fueron desinfectadas en una solución de 50 ppm de hipoclorito de sodio durante 5 minutos, con la finalidad inactivar la carga microbiana presente en la caña. Las cañas después de lavadas y desinfectadas fueron cortadas con una longitud aproximada de 50 cm para luego extraer en un molino el jugo; este jugo fue filtrado y recepcionado en un recipiente de acero inoxidable, para los tratamientos respectivos. Antes del tratamiento el jugo fue caracterizado determinando los sólidos solubles (Brix), pH, y % de azúcares reductores. En la Figura 7 se muestra el diagrama de flujo de extracción del jugo de caña.

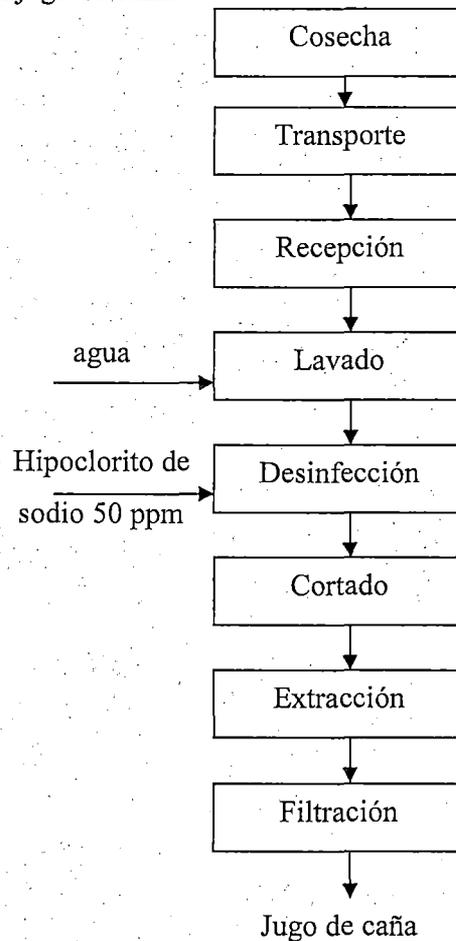


Figura 7. Diagrama de flujo para la Obtención del Jugo de Caña

3.7.2 Segunda Etapa. Aplicación de los Tratamientos

Extraído el jugo de caña se tuvo la muestra lista para el tratamiento, se realizó la aplicación de los tratamientos de acuerdo al diseño experimental de Box Behnken. Inicialmente se agrego ácido ascórbico en concentraciones de 0,1% 0,15% y 0,2, luego se aplicó el tratamiento térmico a temperaturas de 70, 80 y 90°C temperaturas recomendadas por Badui (2006), el tiempo fue de 2, 4 y 6 minutos; además se tuvo una muestra control o testigo sin ningún tratamiento.

Para aplicar el tratamiento térmico se tomaron 50 ml de jugo para cada tratamiento y fueron colocados en vasos de precipitación, luego se colocó en baño maría el cual debe estar a la temperatura correspondiente al tratamiento, al ser introducidos los vasos se debe esperar el tiempo hasta que el jugo tenga la temperatura correspondiente, esto se realiza colocando el termómetro en el jugo de caña, si este se encuentra a la temperatura del tratamiento a partir de allí empezar a contabilizar el tiempo del tratamiento térmico.

3.7.3 Tercera etapa. Extracción de la Enzima

Para extraer la enzima se usó el método de extracción de la Polifenoloxidasas de Potig y Joslyn por citado por Paredes *et al.* (2003).

Luego de la aplicación de los tratamientos se tomó 40 ml de jugo y 160 ml agua destilada helada, luego se centrifugó por 15 minutos a 1500 rpm., el líquido se colocó en un erlenmeyer con tapa de 250 ml, previamente esterilizado, y colocado en baño de hielo picado para ser utilizado como fuente enzimática.

Preparación del sustrato

En un erlenmeyer de 250 ml se adicionó 3 ml de catecol 0,1M y 96ml de tampón fosfato 0,2M, pH 6, se estabilizó la temperatura a 30°C en baño maría.

Al sustrato se le adicionó 1 ml del extracto enzimático, luego se homogenizó rápidamente para realizar las lecturas correspondientes en el espectrofotómetro.

3.7.4 Cuarta Etapa. Determinación de la Inactivación

Se realizaron las lecturas en el espectrofotómetro GENESYS serie 10 UV a una longitud de onda de 420 nm.

La inactivación de Polifenoloxidasas fue determinado de acuerdo a Özođlu y Bayindirli (2002).

$$\% \text{ Inactivación} = \left(\frac{AE_C - AE_T}{AE_C} \right) * 100$$

Donde:

AE_C: Absorbancia de la muestra control o testigo

AE_T: Absorbancia del tratamiento.

3.8 DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Con el fin de optimizar la concentración de ácido ascórbico, temperatura y tiempo de tratamiento térmico a través de la metodología de superficie de respuesta que maximicen la inactivación de la enzima Polifenoloxidasas, se utilizó el diseño Box Behnken con tres factores (K=3) y tres niveles, para evaluar la combinación del efecto de las tres variables independientes: ácido ascórbico, temperatura y tiempo de tratamiento térmico, codificados como X₁, X₂ y X₃ y los niveles asignados como se muestra en el Cuadro 3. La variable respuesta fue inactivación de la enzima Polifenoloxidasas; se empleó un $\alpha = 0,05$.

Cuadro 3: Variables independientes, códigos y valores utilizados en la optimización

Variable independiente	Unidades	Símbolo	Código de niveles		
			-1	0	1
Ácido Ascórbico	%	X ₁	0,1	0,15	0,2
Temperatura	°C	X ₂	70	80	90
Tiempo	Minutos	X ₃	2	4	6

El diseño completo consistió en una matriz de datos que sirvió para ejecutar el Programa Statgraphics Plus 5.1, como se muestran en el Cuadro 4. Con el diseño propuesto se realizaron 3 repeticiones por tratamiento.

Para optimizar las variables de concentración de ácido ascórbico, tiempo y temperatura se aplicó la metodología de superficie de respuesta, el análisis de los datos se realizó con el uso del *software* Statgraphics Plus 5.1.

Cuadro 4: Matriz para el Diseño Box-Behnken

Tratamientos	Concentración de ácido ascórbico (%)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	0,1	70	4
2	0,1	80	2
3	0,1	80	6
4	0,1	90	4
5	0,15	70	2
6	0,15	70	6
7	0,15	80	4
8	0,15	80	4
9	0,15	80	4
10	0,15	90	2
11	0,15	90	6
12	0,2	70	4
13	0,2	80	2
14	0,2	80	6
15	0,2	90	4

3.8.1 Análisis Estadístico de la Evaluación Sensorial del Sabor, Color y Aceptabilidad del Jugo de Caña con tratamiento óptimo y sin tratamiento

Para el análisis estadístico de los resultados de la prueba sensorial entre el jugo de caña sometido al tratamiento optimizado y el jugo de caña sin tratamiento alguno, se

utilizó la prueba de comparación de medias pareadas. (Gutiérrez y De La Vara 2004).
Por lo tanto, el estadístico a calcular es:

$$t_0 = \frac{\bar{d}}{\sqrt{\frac{S^2}{n}}}$$

$$gl = n - 1$$

\bar{d} = Diferencia promedio entre la puntuación de las características sensoriales sin el tratamiento y con el tratamiento.

S^2 = desviación estándar de las diferencias entre las puntuación de las características sensorial sin tratamiento y con tratamiento.

n = Numero de panelistas.

gl = grados de libertad

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 CARACTERIZACIÓN DEL JUGO DE CAÑA

Las muestras de jugo de caña utilizadas en la presente investigación presentaron las siguientes características (Cuadro 5).

Cuadro 5: Características del Jugo de Caña

Característica	Promedio
°Brix	16,3
pH	5,51
Azucares Reductores (%)	1,64

El brix promedio del jugo de caña es de 16,3, este valor coincide con lo que menciona Larrahondo (1995), que refiere que el jugo de caña de buena calidad debe presentar valores de 10 a 17 grados Brix

El pH promedio del jugo de caña es 5,51 esta característica ácida se explica por la presencia natural de una variedad de ácidos naturales presentes en el jugo de caña tales como el aconítico, cítrico, málico, oxálico, tartárico, succínico, fumárico. Durmooa, et.al.(2008) encontraron en su investigación que el pH del jugo de caña extraído es de 5,6 valor similar encontrado en esta investigación.

Larrahondo (1995) refiere que el valor promedio de azucares reductores en jugo de caña madura debe estar entre 1 a 5%, si este valor aumenta puede ser por causa del deterioro o falta de maduración de la planta. El valor encontrado en la presente investigación fue de 1,64, lo que confirma que la caña utilizada para esta investigación se encontraba entre los parámetros requeridos

4.2 EFECTO DEL ÁCIDO ASCÓRBICO, TIEMPO Y TEMPERATURA EN LA INACTIVACIÓN DE LA POLIFENOLOXIDASA EN JUGO DE CAÑA

En el Cuadro 6 se muestra los resultados de inactivación en el jugo de caña tratado, se observa que el porcentaje de inactivación de la enzima Polifenoloxidasas oscila entre 10,34 y 92,86%.

Cuadro 6: Resultados del Porcentaje de Inactivación de la Enzima Polifenoloxidasas en Jugo de Caña

Concentración de Ácido Ascórbico (%)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Porcentaje de inactivación (Repeticiones)		
			1	2	3
0,1	70	4	10,34	10,71	10,34
0,2	70	4	60,34	57,14	62,07
0,1	90	4	67,24	67,86	68,97
0,2	90	4	91,38	92,86	91,38
0,1	80	2	27,59	26,79	27,59
0,2	80	2	68,97	67,86	67,24
0,15	80	4	81,03	82,14	84,48
0,1	80	6	58,62	53,57	56,90
0,2	80	6	72,41	73,21	72,41
0,15	70	2	29,31	26,79	24,14
0,15	90	2	74,14	73,21	74,14
0,15	70	6	55,17	53,57	55,17
0,15	90	6	77,59	80,36	79,31
0,15	80	4	84,48	87,50	86,21

La medida de la actividad enzimática de la polifenoloxidasas está determinada por su cinética, de esta forma se evaluó su disminución o inhibición del pardeamiento enzimático después de los tratamientos aplicados. El método para medir la actividad de Polifenoloxidasas fue por espectrofotometría determinando la longitud de onda (Anexo 4) siendo esta de 420nm este valor es similar encontrado por Gasul y Becerra (2006) quienes caracterizaron a la polifenoloxidasas extraída de pera, así mismo Roquesa y Ligia (2007) y Blach *et al.*, (2010) determinaron la actividad de la Polifenoloxidasas en tallos de claves y rodajas de carambola respectivamente leyendo la absorbancia a 420nm .

En la presente investigación se utilizó el ácido ascórbico, este antioxidante ayudó a inactivar la Polifenoloxidasas, este resultado es corroborado pues en aquellos tratamientos en el cual se utilizó el ácido ascórbico, la inactivación fue mayor. Diversos estudios demuestran que la acción del ácido ascórbico actúa en la inhibición del pardeamiento (Marshall et al., 2000).

El porcentaje más bajo de inactivación de la Polifenoloxidasas es aquel jugo de caña que fue tratado a una temperatura de 70°C por 4 minutos y 0,1% de ácido ascórbico. El máximo porcentaje de inactivación ocurre cuando el porcentaje de ácido ascórbico fue de 0,2%, el tiempo de tratamiento de 4 minutos y la temperatura de 90°C.

En investigaciones similares al aplicar tratamiento térmico a jugos de manzana se determinó que la actividad enzimática de la polifenoloxidasas es reducida dependiendo del tiempo y la temperatura al que es sometido. A 60°C después de 5 minutos de tratamiento se inactivó el 56% de la actividad enzimática, mientras que a 80°C después de 5 minutos se inactivó la polifenoloxidasas en un 98% (Herrera, 2007) comparándolo con los tratamientos utilizados se encuentran similitudes respecto a la reducción de la actividad enzimática en el jugo de caña el cual sometido a temperaturas de 90°C y 4 minutos de tratamiento se tiene una inactivación promedio de 92 % de inactivación de la Polifenoloxidasas. Así mismo Gasul y Becerra (2006) Determinaron el efecto de la temperatura sobre la actividad de Polifenoloxidasas, determinaron que la temperatura óptima para la actividad de Polifenoloxidasas de pera es 25°C, mientras que para manzana es 30°C, pero esta actividad desciende bruscamente cuando se aumenta la temperatura a distintos tiempos, incubando la enzima durante 30 minutos a 30°C, la misma permanece inalterada, pero al calentar la

enzima durante 20 minutos a 50°C, la actividad de la misma disminuye un 40 %, y se encuentra prácticamente inactivada calentando durante 10 minutos a 70°C. En cuanto a la Polifenoloxidasas de manzana, esta disminuye en un 40% cuando es calentado durante 20 minutos a 50°C, pero, a diferencia de lo ocurrido con la Polifenoloxidasas de pera, la inactivación prácticamente total se produce calentando 30 minutos a 70°C.

En la Figura 8 se presentan los efectos estandarizados para evaluar la significancia estadística de los factores y la interacción entre ellos sobre el porcentaje de inactivación de la enzima Polifenoloxidasas en el jugo de caña, en dicha figura se muestra el efecto obtenido como consecuencia de la aplicación de los tratamientos. En el gráfico N° 8 se identifica la influencia de las variables siendo la temperatura y el ácido ascórbico los que mayor influencia tienen en la inactivación enzimática. La temperatura, concentración de ácido ascórbico y el tiempo tiene una significancia positiva en la inactivación de la Polifenoloxidasas, las interacciones de los tratamientos también tiene influencia significativa.

Según Lee *et al.* (1988) la temperatura ejerce un mayor efecto que otras variables como el pH, coincidiendo con lo reportado por Vámos-Vigyázó (1981), que establecieron la destrucción de la actividad catalítica en un rango de temperatura de 70 a 90°C, seguida por el efecto del pH del medio y tiempo de tratamiento.

En la Figura 9 se presentan los efectos principales de la concentración, temperatura y tiempo en esta se puede observar, según el modelo Box Behnken en la figura se muestra el efecto que ejercen sobre la inactivación de la enzima PFO, a medida que aumenta la temperatura la inactivación de la enzima aumenta, lo mismo sucede con la concentración de ácido ascórbico y el tiempo dado a los tratamientos.

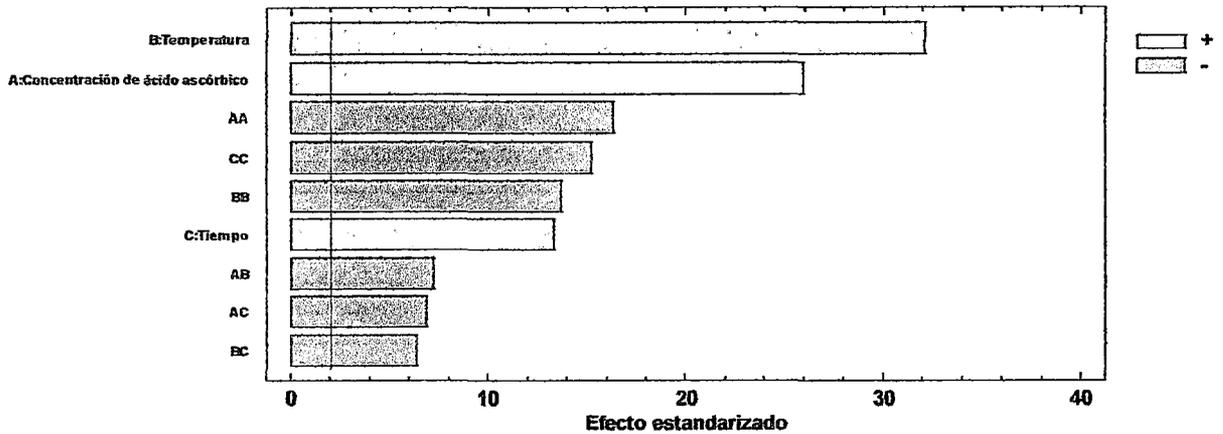


Figura 8. Gráfico del Efecto de las Variables en la Inactivación de la Enzima Polifenoloxidasasa

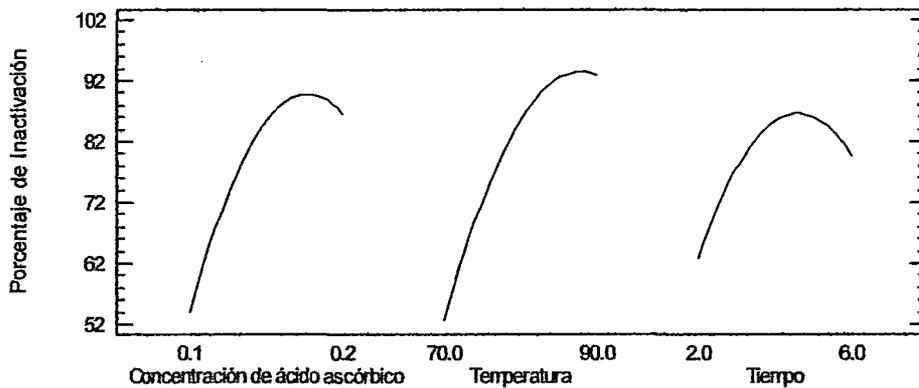


Figura 9. Representación de los Efectos de las Variables en la Inactivación de la Enzima Polifenoloxidasasa

En el Cuadro 7 se muestra el resultado del Análisis de Varianza (ANOVA) del modelo, en el que se divide la variabilidad de la inactivación de Polifenoloxidasasa en distintos segmentos separados para cada uno de los efectos (tratamientos y sus interacciones).

Cuadro 7: Análisis de varianza para porcentaje de inactivación de polifenoloxidasas

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Concentración de ácido ascórbico	6361.9	1	6361.9	673.81	0.0000
B:Temperatura	9734,47	1	9734,47	1031,01	0,0000
C:Tiempo	1675,34	1	1675,34	177,44	0,0000
AA	2527,0	1	2527,0	267,64	0,0000
AB	489,091	1	489,091	51,80	0,0000
AC	446,032	1	446,032	47,24	0,0000
BB	1765,75	1	1765,75	187,02	0,0000
BC	384,201	1	384,201	40,69	0,0000
CC	2196,44	1	2196,44	232,63	0,0000
Error total	330,46	35	9,44172		
Total (corr.)	25052,9	44			

Como se puede observar en el ANOVA todos los factores e interacciones y sus efectos cuadráticos resultaron significativos por tener un P_valor menor que 5%, lo que significa que la Concentración de ácido ascórbico, temperatura, tiempo y sus respectivas interacciones y efectos cuadráticos influyen en la inactivación de la polifenoloxidasas.

El ácido ascórbico por sí mismo no es un inhibidor de la Polifenoloxidasas, este actúa sobre el sustrato y se oxida a ácido dehi-hidroascórbico, reduciendo la quinona a fenol. Gasull y Becerra (2006), analizaron el efecto inhibitorio de ácido ascórbico, ácido benzoico y cloruro de sodio en la inactivación de la Polifenoloxidasas en pera y manzana, frente a catecol como sustrato, del análisis de los datos obtenidos al determinar el efecto inhibitorio, se encontró que el inhibidor más potente para polifenoloxidasas de las frutas analizadas es el ácido ascórbico, que presenta una inactivación del 50%. El ácido ascórbico actúa más como un antioxidante que como un inhibidor enzimático porque el mismo reduce la quinona formada inicialmente por la enzima al difenol original, antes que se produzcan las reacciones secundarias, las cuales dan lugar a la formación de los pigmentos. El ácido ascórbico también ha sido reportado como causa irreversible de inhibición enzimática (Golan et al., 1984). Además determinaron los efectos de la

estabilidad térmica de Polifenoloxidasas incubando a las temperaturas 30, 40, 50, 60 y 70°C, teniendo un efecto significativo a medida que se aumenta la temperatura, este efecto también sucede en presente investigación en la cual se determinó la inactivación de polifenoloxidasas a concentraciones de 0,1%, 0,15% y 0,2 % de ácido ascórbico a temperaturas de 70, 80, 90°C.

Con respecto al estadístico R^2 indica que el 98,348% de la variación explicada en el porcentaje de inactivación de la enzima polifenoloxidasas depende de la concentración de ácido ascórbico, temperatura y tiempo, interacciones y efectos cuadráticos, por lo tanto la ecuación de regresión para ajustar los datos experimentales fue obtenida del programa Statgraphics 5.1 Plus:

$$IPFO = -1422,03 + 3403,44(Cas) + 25,2627 + 64,12t - 6041,61(Cas)^2 - 12,77(Cas)T - 60,97(Cas).t - 0,13t^2 - 0,28.T.t - 3,52t^2$$

Donde:

- IPFO : Inactivación de Polifenoloxidasas (%)
- [CAs] : Concentración de ácido ascórbico (%)
- T : Temperatura (°C)
- t : Tiempo (min)

El análisis estadístico indica que el modelo propuesto fue el adecuado, ya que en relación al valor de R^2 correspondiente al porcentaje de inactivación de la polifenoloxidasas este fue de 98,348%, Gutiérrez y De La Vara (2008) señalan que cuanto más cerca esté al 100% los modelos propuestos se ajustan mejor a los datos reales. Por otra parte, cuanto menor sea el valor de R^2 menor importancia tienen las variables dependientes en el modelo al explicar el comportamiento de las variaciones. Los valores de probabilidad (P) de todos los modelos de regresión fueron de 0.000, por lo tanto no hubo necesidad de eliminar alguno de los términos en la ecuación de regresión.

4.3 OPTIMIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO ASCÓRBICO, TEMPERATURA Y TIEMPO PARA LA INACTIVACIÓN DE LA ENZIMA POLIFENOLOXIDASA EN JUGO DE CAÑA

La relación de las variables en el efecto de la inactivación de la enzima polifenoloxidasas muestran una representación de superficie de respuestas de forma alabeada y de variación local suave (Figura 10), tal como lo refiere Gutiérrez y De La Vara (2008).

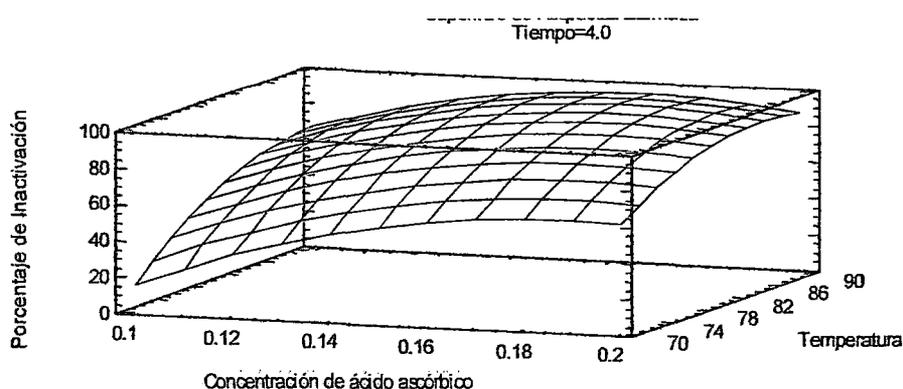


Figura 10. Superficie de respuesta de la inactivación de la enzima polifenoloxidasas

En la Figura 10 se presenta el gráfico de contorno de las superficies de respuesta de la inactivación de la enzima polifenoloxidasas. En el nivel más bajo se observa que la inactivación es más lenta, incrementándose posteriormente hasta alcanzar el nivel esperado (95,6 % de inactivación). El efecto de todas las variables se da en razón a la disminución de la actividad catalítica, Díaz *et al.* (1995) encontraron que cuando el pH desciende a valores menores de 6.5, paulatinamente se inactiva la enzima hasta una total inactivación a pH entre 2 y 2,5, lo mismo sucede con el jugo de caña donde su pH desciende al agregarle el ácido ascórbico. Por otro lado Veliz (2004) evaluó la tendencia de la inactivación con respecto a la temperatura y tiempo de tratamiento y estableció que existe un efecto combinado, además de que al incrementarse la temperatura y transcurrir el tiempo, mayor será la inactivación de la enzima.

En las Figuras 11,12 se presentan el gráfico de contorno de la inactivación de la enzima polifenoloxidasas, y la optimización de las variables independientes. La mejor combinación (punto central) muestra el nivel de tratamiento óptimo en la inactivación. Las

variables que maximizaron la inactivación se obtuvo una concentración de ácido ascórbico (0,17%), a una de temperatura 86,8°C constante por el tiempo de tratamiento de 4,15 minutos, definido como tratamiento optimizado.

En la Figura 13 se muestra los puntos del tratamiento optimo teniendo en cuenta las variables de tiempo, concentración de ácido ascórbico y la temperatura, en esta se muestra el porcentaje de inactivación al optimizar las variables independientes.

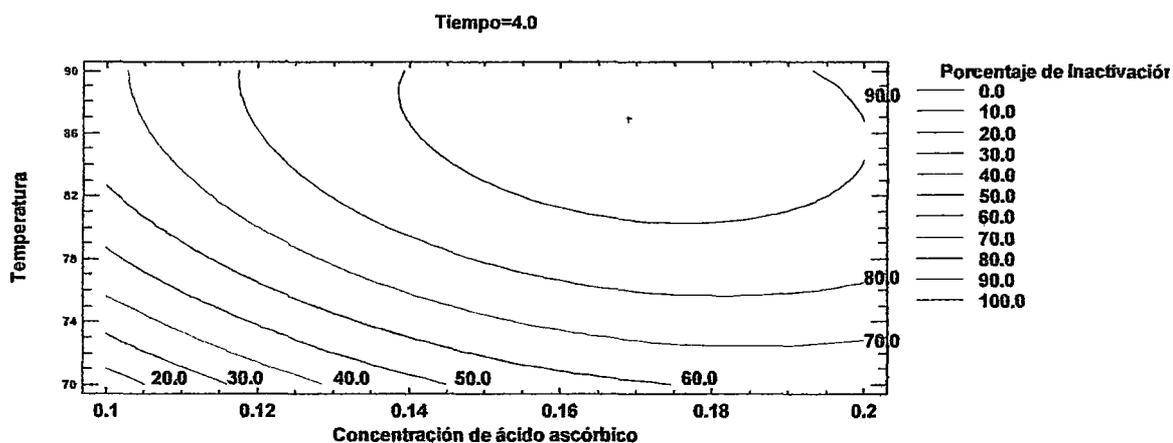


Figura 11. Contornos de superficie de respuesta para establecer los parámetros óptimos de tratamiento.

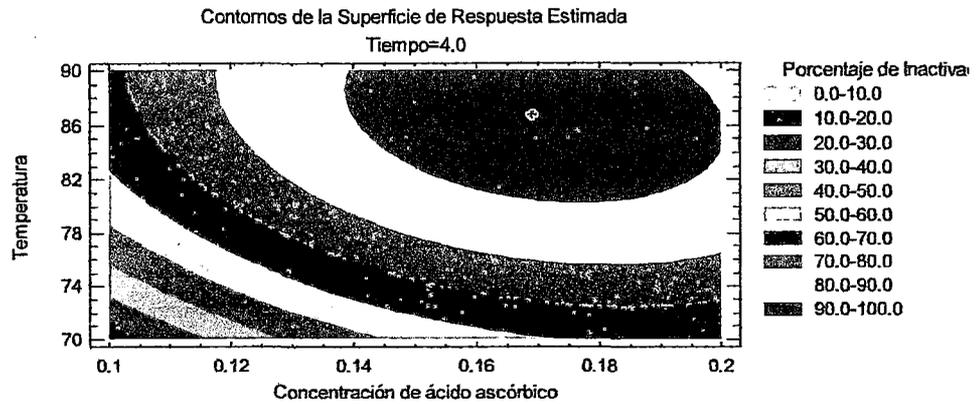


Figura 12. Contornos de superficie de respuesta para establecer los parámetros óptimos de tratamiento

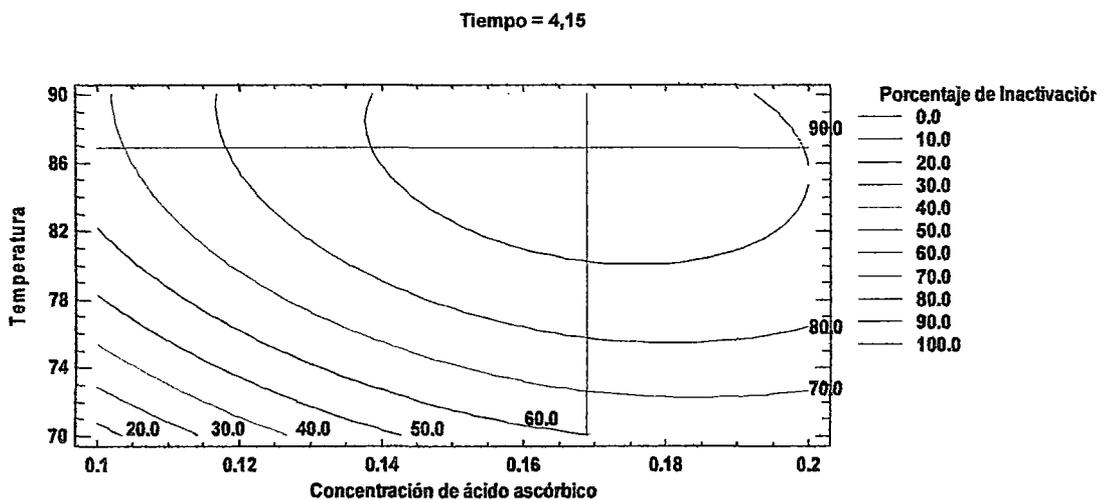


Figura 13. Contornos de superficie de respuesta: Punto Óptimo

En el Cuadro 8 se muestra los resultados de optimización de niveles de los factores que maximizan el porcentaje de inactivación de la polifenoloxidasas en el jugo de caña, los niveles óptimos encontrados son: 0,17% de concentración de ácido ascórbico, 86,84°C y 4,15 minutos los cuales nos dan como respuesta un 95,6% de inactivación de la Enzima polifenoloxidasas. Paredes *et al.* (2003) quienes realizaron la comparación de la inactivación de polifenoloxidasas en jugo de caña a diferentes pH (4 y 5) y diferentes

temperaturas y tiempos, determinando que las mejores condiciones de inactivación son a un pH de 4, 80°C y 4 minutos de pasteurización.

Cuadro 8: Niveles de Parámetros de Tratamiento en la Maximización de la Inactivación de la Enzima Polifenoloxidasa

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Concentración de ácido ascórbico (%)	0,1	0,2	0,17
Temperatura (°C)	70,0	90,0	86,84
Tiempo (min)	2,0	6,0	4,15

Meta: maximizar porcentaje de inactivación valor óptimo = 95.5806

Avallone *et al.* (2000), reportan porcentajes de inactivación que llegan hasta el 100% mediante el uso de enzimas inhibidoras. Villegas *et al.* (2006) reportan resultados similares a los encontrados en la optimización.

Millan y Roa (2001) evaluaron el pardeamiento en cambur procesado por impregnación al vacío, mediante el análisis de superficie de respuesta a partir de los datos experimentales lograron establecer mediante esta metodología los niveles óptimos de jarabe con 300 ppm de sulfito de sodio, 1% de ácido L-ascórbico, 1% de ácido cítrico y 30% de sacarosa para minimizar el cambio neto de color del cambur.

4.4 EVALUACIÓN SENSORIAL DEL SABOR, COLOR Y ACEPTABILIDAD DEL JUGO DE CAÑA CON TRATAMIENTO ÓPTIMO DE INACTIVACIÓN ENZIMÁTICA

Se realizó la evaluación sensorial a través de la prueba del grado de satisfacción en cuanto al sabor, color y aceptabilidad general, tanto para el jugo de caña con tratamiento óptimo así como para el jugo de caña sin tratamiento. Los resultados del promedio y de la desviación estándar de los 100 panelistas consumidores que evaluaron ambos productos se muestran en la Cuadro 9. En los Anexos 3 y 4 se presentan los resultados de la prueba sensorial realizada. Asimismo en el Cuadro 10 se presenta los resultados del análisis estadístico de las pruebas de comparación de medias.

Cuadro 9. Resultados de la Prueba del Grado de Satisfacción del Jugo de Caña

Características Evaluadas	Jugo de Caña con Tratamiento Óptimo		Jugo de Caña sin Tratamiento	
	Promedio	Desviación Estándar	Promedio	Desviación Estándar
Color	3,38	0,850	1,43	0,573
Sabor	3,62	0,616	3,71	0,715
Aceptabilidad general	3,58	0,781	1,85	0,609
Número de panelistas	100			

Cabe mencionar que las pruebas de T de student para muestras pareadas entre otras se usan solo para cuando se desea comparar resultados entre dos muestras. En los Anexos 12,13,14 se muestra el análisis estadístico.

Cuadro 10. Resultados de la Prueba de Comparación de Medias Pareadas ($\alpha=0.05$)

ATRIBUTO	T	p-valor	RESULTADO
Color	-1.95	0,000	Se rechaza la hipótesis nula
Sabor	0,09	0,341	Se acepta la hipótesis nula
Aceptabilidad general	-1.73	0,000	Se rechaza la hipótesis nula

En relación al grado de satisfacción por el color, el jugo de caña con tratamiento óptimo obtuvo un promedio de 3,38 equivalente al nivel de me agrada mucho, en comparación con el grado de satisfacción por el color en el jugo de caña sin tratamiento con un promedio de 1.43 equivalente a me desagrada mucho. Al realizar la comparación de medias entre el grado de satisfacción por el color de las muestras evaluadas, se obtuvo que existió diferencias significativas a un nivel $\alpha = 0,05$, por lo que la muestra que obtuvo el mejor color fue la de jugo de caña con tratamiento óptimo.

En cuanto al grado de satisfacción por el sabor se observa que tanto el jugo de caña con tratamiento óptimo (3,62) así como el jugo de caña sin tratamiento (3,71) obtuvieron el mismo nivel de agrado, es decir me agrada mucho; a través de prueba de comparación de medias se obtuvo que no existen diferencias significativas a un $\alpha = 0,05$, por lo que se considera que el sabor de las muestras agrada en la misma medida a los panelistas consumidores.

En relación a la aceptabilidad general, la tendencia es muy similar que lo ocurrido en la evaluación del color, a un nivel de $\alpha = 0,05$ se obtuvo que existe diferencia significativa en la aceptabilidad general de las muestras. La muestra con mayor nivel de aceptabilidad general fue el jugo de caña con tratamiento óptimo (3,58 ~ me agrada mucho) en comparación con el jugo de caña sin tratamiento (1,85 ~ me desagradó mucho). El jugo de caña con tratamiento óptimo presentó la mayor aceptabilidad general.

Los resultados obtenidos refuerzan la hipótesis de la presente investigación, en el sentido que el tratamiento optimizado es capaz de inhibir el efecto de pardeamiento del jugo (efecto en el color) sin afectar su sabor, al ser comparado con el jugo de caña sin tratamiento. Adicionalmente. El jugo de caña sometido al tratamiento óptimo, produjo en el panel sensorial una mejor calificación en color y en aceptabilidad general.

V. CONCLUSIONES

1. Se determinó que la concentración de ácido ascórbico, temperatura y tiempo al que fue sometido el jugo de caña tienen influencia significativa sobre la inactivación de la enzima Polifenoloxidasas.
2. Mediante la metodología de superficie de respuesta se obtuvo que el tratamiento óptimo capaz de conseguir una inactivación de la polifenoloxidasas en un 95,6% es a una concentración de 0,17% de ácido ascórbico, temperatura a 86,8°C y tiempo de 4.15 minutos.
3. El jugo de caña sometido al tratamiento óptimo no presenta diferencia significativa respecto al sabor frente al jugo de caña sin tratamiento, obteniéndose como respuesta promedio me agrada mucho.
4. El jugo de caña sometido a tratamiento óptimo presenta una mejor calificación en relación con el jugo de caña sin tratamiento en las características de color y aceptabilidad general (me agrada mucho).

V. RECOMENDACIONES

1. Realizar la caracterización de la Polifenoloxidasa extraída del jugo de caña
2. Realizar el tratamiento de la caña antes de extraer el jugo y evaluar la inactivación de la Polifenoloxidasa.
3. Realizar un estudio de vida en anaquel del jugo de caña con la finalidad de determinar el tiempo de vida útil

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alzamora, S.M., Guerrero, S.N., Nieto, A.B. & Vidales, S.L. 2004. Conservación de frutas y hortalizas mediante tecnologías combinadas. Servicio de Tecnologías de Ingeniería Agrícola y Alimentaria (AGST) Dirección de Sistemas de Apoyo a la Agricultura (AGS). FAO. N.Y. 79 p.
2. Amerine A, Pangborn R y Roessler E. 1965. Principles of Sensory Evaluation of Food. Academic Press, INC. New York USA. 602p.
3. Amiot, M.J. 1997. Phytochemistry of fruits and vegetables. Phenolic compounds and oxidative mechanisms in fruit and vegetables., Oxford: Clarendon Press. 51-85p.
4. Anzaldúa – Morales A. 1994. La Evaluación Sensorial de los alimentos en la Teoría y la Práctica. Editorial Acribia. S.A Editorial Acribia Zaragoza España. 220 p.
5. AOAC (Association of Official Analytical Chemist). 1995. Official Methods Analysis. 16va edition. Vol:1-2
6. Avallone, C.; Cravzov, A.; Montenegro, S. y Pellizzari, E. 2000. Estudio de la actividad de la peroxidasa, pectinasa y polifenoloxidasa en extracto enzimático de sandía (*Citrullus vulgaris schard*). Disponible en <http://www1.unne.edu.ar/cyt/2001/7-Tecnologicas/T-074.pdf>. Accesada el 22 de Junio.
7. Ayala, J. y Pardo, R. 1995. Optimización por Diseños Experimentales con Aplicaciones en Ingeniería. CONCYTEC. Perú. 266 p.
8. Badui, S. 2006. Química de los Alimentos. 4ta Edición. Editorial Pearson Educación. Mexico. 730 p.

9. Belitz, H. & Grosh, W. 2004. Química de los Alimentos. Editorial Acribia S.A., Zaragoza. 105-172 p.
10. Blach, D.; Donado, J y Pinzón, M. 2010 Actividad de la peroxidasa y polifenoloxidasas en Rodajas de Carambola (*Averrhoa Carambola L.*) Fresco Cortado durante su almacenamiento en Atmosfera Modificada. Actas de Asociación Colombiana de Ciencia y Tecnología de alimentos. Disponible en <http://www.acta.org.co/pdf/Revista20/Cuarto/Cuarto.pdf>
11. Calvo, M. 2007. Bioquímica de los alimentos. Disponible en <http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/enzimas/tirosinasa.html>. Accesada el 20 de Junio 2007.
12. Castillo, J. 2001. Evaluación Agro económica de Insecticidas para el control de insectos plaga del Suelo (*Scaptocoris Talpa* (Hemíptera: Cydnidae) *Agriotes Spp*; *Conoderus Spp* (Coleóptero: Elateridae)) en el cultivo de Caña de Azúcar (*Saccharum Officinarum*); Concepción, Escuintla, Guatemala. Tesis para el Título de Ingeniero Agrónomo. Universidad de San Carlos de Guatemala. 152 p.
13. Costell E, Durán L. 1981 a. El Análisis Sensorial en el Control de Calidad de los Alimentos. II. Planteamiento y Planificación : Selección de Pruebas. Revista Agroquímica y Tecnología de Alimentos. Vol 21. Num 2. 149 – 166 p.
14. Costell, E; Durán, L. 1981 b. El Análisis Sensorial en el Control de Calidad de los Alimentos. III. Planificación, Selección de jueces y Diseño Estadístico. Revista. Agroquímica y Tecnología de Alimentos Vol 21. Num 4. 454 – 470 p.
15. Costell E, Durán, L. 1982. El Análisis Sensorial en el Control de Calidad de los Alimentos. IV. Realización y Análisis de datos. Revista Agroquímica y Tecnología de Alimentos. Vol 22. Num 1. 1 – 21p.
16. Che, M. 1990. Guía de la Fabricación de Azúcar de Caña. Universidad Nacional de Trujillo. Perú. 116 p.
17. Cheftel, J y Cheftel, H. 1992. Introducción a la Bioquímica y Tecnología de los Alimentos. Editorial Acribia . Zaragoza España. 333 p

18. Cornell, J. 1990. How to apply Response Surface Methodology. American Society for Quality Control. New York. U.S.A. 80 p.
19. Dávila, R.; Gómez, V.; Navarro, A.; Lazcano, M.; Ávila, R.; González F. 2007. Evaluación de α -Ciclodextrina como Controlador del Oscurecimiento Enzimático en Pera D'Anjou (*Pyrus communis* var. D'Anjou) Durante la Elaboración de Néctar. Mexico. Rev. Industria Alimentaria 1: 21-24 p.
20. Dawley, R.M., Flurkey, W. 1993. 4-hexylresorcinol, a Potent Inhibitor of Mushroom Tyrosinase. Journal of Food Science, 58 (3): 609-613p.
21. Díaz, L.; Yagman, F.; Marin, E.; Arancibia, L.; Magna M. 1995. Industrialización de la Chirimoya (*Annona Cherimola* Mill). Obtención de la pulpa y su estabilidad en almacenamiento. Chile. Alimentos. 20(12): 66-80 p
22. Durmooa, S. ; Richard, B. ; Beranger, G y Moutiab, Y. 2008. "Biocorrosion of stainless steel grade 304L SS304L in sugar cane juice ". Electrochimica Acta 54:74 - 79p
23. Elias, C.; Salvat, B.; Morales, E. 2006. Optimización por Aplicación del Método de Superficie de Respuesta en Productos Cárnicos. Editorial Agraria. Lima. Perú. 103 p
24. Gasull, E.; Becerra, D. 2006. Caracterización de polifenoloxidasas extraídas de pera (cv. Packam's Triumph) y Manzana (cv. Red Delicious). Inf. Tecnol. 17(6): 69-74 p.
25. Gauillard, F.; Forget, F. 1997. Polyphenoloxidasas from Williams pear (*pyrus communis* L, cv Williams): activation, purification and some properties. Journal of the Science of Food and Agriculture. 74: 46-56 p.
26. Golan, A., Goldhirsh, A y Whitaker, J. 1984. Effect of ascorbic acid, sodium bisulfite and thiol compounds on mushroom polyphenoloxidase, Journal of Agricultural Food Chemistry, 32, 1003-1009.
27. Guerrero Beltran, J. A., Swanson, B.G & Barbosa- Canovas. 2004. Inhibition of polyphenoloxidase in mango puree with 4-hexylresorcinol, cysteine and ascorbic acid. LWT-Food Science and Technology, 38: 625-630p.

28. Gutiérrez, H. y De La Vara, R. 2008. Análisis y Diseño de Experimentos. Editorial McGraw Hill. México. 571 p.
29. Herrera, C.; Bolaños, N. y Lutz, G. 2003. Química de Alimentos. Manual de Laboratorio. Editorial Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. 123 p
30. Herrera, T. 2007. Efecto de las Altas Presiones dinámicas sobre la actividad de la Polifenoloxidasas en jugo de Manzana. Tesis Licenciatura en Ingeniería de Alimentos. Universidad de las Américas Puebla. Cholula. Puebla. México. Disponible en http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lia/celis_h_t/
31. INDECOPI (Instituto Nacional de Defensa de la Competencia y Protección de la Propiedad Intelectual). 2005. NTP 207.001. 2005. Azúcar: Definición, clasificación y requisitos. Norma Técnica Nacional. Perú.
32. IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology Enzyme) Nomenclature Committee. 2005. Gran Bretaña.
33. Klapp, J., Richard, F.C., Goupy, P.M. y Nicolas, J.J. 1990. Inhibition studies on apple polyphenol oxidase. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 38(4): 926-931p.
34. Kubo, I. y Kinst-Hori. 1998. Tyrosinase Inhibitors from cumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 5338-5341p.
35. Larrahondo, J. E. 1995. CENICANA. Disponible en www.cenicana.org: Accedido el 5 de Mayo de 2010)
36. Laurila, E. y Ahvenainen R. 2002. Minimal processing of fresh fruits and vegetables. En Jongen W. *Fruit and vegetable processing. Improving quality*. Cornwall: CRC Press. 288-309p.
37. Lee, C.; Smith, N. y Hawbecker, D. 1988. Enzyme activity and quality of frozen green beans as affected by blanching and storage. *J. Food Qual.* 11: 279-287 p.
38. Lee, C. y Whitaker, J. 1995. Enzymatic browning and its prevention. *American Chemical Society Division of Agricultural and Food Chemistry*, D.C. Washintong. 338 p.

39. Lu, S., Luo., Turner, E. y Feng, H. 2007. Efficacy of sodium chlorite as an inhibitor of enzymatic browning in apple slices. *Food Chemistry* 104: 824–829p.
40. Marshall, M. R., Kim. J. , Eongmok y Wei, C. 2000. Enzymatic Browning in Fruits, Vegetables and Sea foods. FAO, Nueva York. Disponible en: <http://www.fao.org/ag/Ags/agsi/ENZYMEFINAL/Enzymatic%20Browning.html> (consultada en Junio del 2009).
41. Martinez, V.y Whitaker, J.1995.The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends in Food Science & Technology* 6:195-200.Gran Bretaña
42. Matheis, G y Whitaker, J. 1984. Modification of proteins by polyphenol oxidase and peroxidase and their products, *Journal of Food Biochemistry*. 8: 137-162 p.
43. McEvily, A.; Iyengar, R y Otwell, S. 1992.Inhibition of Enzymatic Browning in Foods and Beverages. *Critical Review in Food Science and Nutrition*. 32(3): 253-273p.
44. Milacatl, V. 2003 Cambios en atributos sensoriales y degradación de ácido ascórbico en función de la temperatura en puré y néctar de mango]. Puebla, Mexico Universidad de las Américas, Departamento de Ingeniería Química y Alimentos. Disponible en http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/navegacion/carrera_lia.html
45. Millan, F y Roa, V. 2001.Uso de la metodología de superficie de respuesta en la evaluación del pardeamiento en cambur procesado por impregnación al vacío. *Interciencia*. Caracas Venezuela. 26:7 290-295 p.
46. Montgomery, D. 1991. Diseño y Análisis de Experimentos. 1ra Edición. Grupo Editorial Iberoamérica S.A. Mexico. 589 p.
47. Montgomery, D. 2006. Diseño y Análisis de Experimentos. 2da Edición. Editorial Limusa S.A. México.686 p.
48. Oh, S., Lee J.; Kim, M. R; Yook, H y Byun, M. 2005. The effect of γ irradiation on the non-enzymatic browning reaction in the aqueous model solutions. *Food Chemistry* 92: 357–363p
49. Okayasu H. y Naito S. 2001. Sensory Characteristic of Apple Juice Evaluated by Consumer and Trained Panels. *Journal of Food Science* 66: 10 25-1029 p.

50. Otwell, W.S.I., R.; And Mcevely, A. J.1992. Inhibition of shrimp melanosis by 4-hexylresorcinol. . J. Aquat. Food Product Technol. 1: 53 – 65p.
51. Özođlu, H. y Bayindirli, A. 2002. Inhibition of enzymic browning in cloudy in apple juice with selected antibrowning agents. Food Control 13: 213-221 p.
52. Palmer, J. K. 1961. Banana Polyphenoloxidase. Preparation y Properties. Plant Physiology, 36: 508-513p.
53. Paredes, A.; Ramos,G y Paredes, M. 2003. Efecto del pH sobre el tratamiento Térmico de la Enzima polifenoloxidasas en Jugo de Caña de Azúcar (*Sacharum officinarum*).Alimentos Ingeniera de. Universidad Técnica de Ambato. Ecuador. 12(2): 64 -73 p.
54. Pedrosa R. 1975. Fabricación de Azúcar Crudo de Caña. La Habana. 351p.
55. Pizzocaro F., Torreggiani, D y Gilardi, G. 1993. Inhibition of applepolyphenoloxidase (PPO) by ascorbic acid, citric acid and sodium chloride. Journal and Food Processing and Preservation, 17: 21-30p
56. Pulido, H. y De La Vara.2009. Control Estadístico de Calidad y Seis Sigma. 2da Edición. Editorial McGraw Hill/Interamericana Editores S.A. México. 482p
57. Queiroz, C., Lopez, M.L.M., Fialho, E. y Valente-Mesquita, V.L. 2008.Polyphenol Oxidase: Characteristics and Mechanisms of Browning Control. Food Reviews International, 24: 361-375p.
58. Reyes, G.; Corzo, O y Bracho, N. 2005. Optimización de la Deshidratación Osmótica de Sardina Mediante la Metodología de Superficies de Respuesta, R.C, 15(4): 377-384p.
59. Rivas, N. 1997. Purificación parcial y caracterización cinética de la polifenoloxidasas del Cambur Manzano.(*Musa [AAB] cv. 'manzano'*).Rv. Facultad de Agronomía. Maracay. Venezuela. 9(4):34-49 p.
60. Roquesa, V., Liga, B., 2007. Aislamiento y Caracterización de Polifenoloxidasas Relacionada con la Tolerancia del Clavel (*Dianthus Caryophyllus*) A *Fusarium Oxysporum* F. Sp. Dianthi Raza 2. Acta biol. Colomb., Vol. 12 No. 2, 2007. 81 – 94p.

61. Rosas, D. 2001. Construcción de Mapas Perceptuales y la Caracterización de Productos Alimenticios : Jamonadas. Tesis para optar el Título de Ingeniero en Industrias Alimentarias UNALM. Lima 55p.
62. Sawamura, M., Nakagawa, T., Katsuno, S., Hamaguchi, H. y Ukeda, H. 2000. The Effects of Antioxidants on Browning and on Degradation Products Caused by Dehydroascorbic Acid. *Food Chemistry and Toxicology*, 65(1): 20-23p.
63. Schmidt, H y Pennacchioti, I. 2001. Las Enzimas en los Alimentos: su Importancia en la Química y la Tecnología de los Alimentos. Disponible en http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_quimicas_y_farmaceuticas/schmidth02/index.html. Accesada el 10 julio 2009.
64. Soliva-Fortuny, R.; Elez-Martínez, P.; Calderó M. y Martín-Belloso, O. 2002. Kinetics of polyphenol oxidase activity inhibition y browning of avocado purée preserved by combined methods. *Journal of Food Engineering Gran Bretana* 55:131-137p.
65. Soliva-Fortuny, R.; Elez-Martínez, P.; Calderó M.; Martín-Belloso, O. 2004. Effect of combined methods hue of preservation on the naturally occurring microflora of avocado purée. *Food Control* 15: 11-17 p.
66. Spencer, M. 1967. Manual del Azúcar de Caña. 9na Edición. Montaner y Simona S.A. Barcelona España. 940 p.
67. Ureña, M y D Arrigo, M y Girón. O. 1999. Evaluación Sensorial de los Alimentos. Primera Edición. Editorial Agraria .Lima Perú.199 p.
68. Vámos-Vigyázó, L. 1981. Polyphenoloxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 15: 49-127 p.
69. Veliz, N. 2004. Control del pardeamiento enzimático de la alcachofa por factores combinados Disponible en [http://www.uncp.edu.pe/Facultades/ Industrias/investigacion/2005_1.htm](http://www.uncp.edu.pe/Facultades/Industrias/investigacion/2005_1.htm) . Accesada el 9 agosto 2007.
70. Villegas M.; Ayala, J y Cruz, R. 2006. Efecto antioxidante de extractos naturales en manzana "Red Delicious". *Mundo Alimentario*. 5: 24-29 p.

71. Watts B, Ylimaki G, Jeffery L y Ellias L. 1992. Métodos Sensoriales Básicos para la Evaluación de Alimentos. Editorial CIID. Otawa. Canada. 170 p.
72. Witting de Penna E. 1981. Evaluación Sensorial: una Metodología Actual para la Tecnología de Alimentos Edición, Chile. 134 p.
73. Wesche-Ebeling, P. y Montgomery, M.W. 1990. Strawberry Polyphenoloxidase: Purification and Characterization. *Journal of Food Science*, 55 (5): 1315-1319p.
74. Whitaker, J.1972. Principles of Enzymology for the Food Science. New York. Marcell Dekker, Inc. 636 p.
75. Zook K. y Wessman C. 1977. The selection and use of judges for descriptive panels. *Food Technol* 31:56-61p

Anexo 1

Formato de la Prueba Sensorial del Jugo de Caña

Nombre:Fecha.....

Por favor evalúe las dos muestra presentada de jugo de caña en cuanto al color, sabor y aceptabilidad general y marque según corresponda.

Escala	Color		Sabor		Aceptabilidad General	
	347	418	347	418	347	418
1. Me desagrada mucho						
2. Me desagrada						
3. No me agrada ni me desagrada						
4. Me agrada						
5. Me agrada mucho						

Comentarios.....

Gracias por su apoyo a la presente investigación

Anexo2

Resultados de la Prueba Sensorial del Jugo de Caña: Tratamiento Óptimo (418)

Panelistas	Color	Sabor	Aceptabilidad
1	3	3	4
2	4	4	5
3	2	3	3
4	3	3	3
5	4	4	4
6	4	3	4
7	3	4	4
8	4	4	4
9	2	4	3
10	1	4	4
11	4	4	3
12	4	3	3
13	4	3	3
14	4	3	4
15	3	3	4
16	3	3	4
17	4	4	3
18	4	4	4
19	3	4	3
20	3	4	4
21	2	4	3
22	3	4	5
23	3	4	3
24	3	4	2
25	4	4	4
26	4	4	4
27	4	4	4
28	4	4	3
29	4	4	4
30	3	3	3
31	4	3	4
32	5	4	5
33	3	4	4
34	3	3	3
35	4	3	3

...Continuación

36	4	4	4
37	3	4	3
38	5	4	4
39	3	4	3
40	3	3	4
41	3	3	4
42	4	4	4
43	2	4	3
44	3	4	4
45	3	4	4
46	3	3	4
47	4	3	4
48	4	4	4
49	4	5	4
50	3	4	4
51	5	3	4
52	4	4	4
53	4	3	3
54	2	4	3
55	3	4	2
56	3	3	4
57	4	4	4
58	3	4	5
59	3	3	3
60	1	2	2
61	4	3	4
62	3	4	5
63	3	4	3
64	3	4	2
65	4	4	4
66	4	4	4
67	3	4	3
68	5	5	5
69	3	4	3
70	2	2	2
71	4	4	5
72	4	4	3
73	3	3	4
74	4	4	4
75	3	4	5

...Continuación

76	3	3	3
77	2	3	3
78	4	4	4
79	4	5	4
80	3	4	4
81	5	3	4
82	4	4	4
83	4	3	3
84	2	4	3
85	3	4	2
86	4	3	4
87	3	3	3
88	2	2	2
89	3	3	3
90	2	2	2
91	4	3	4
92	3	4	5
93	5	4	3
94	3	4	4
95	5	3	4
96	4	4	4
97	4	3	3
98	2	4	3
99	3	4	2
100	3	4	4

Anexo 3

Resultados de la Prueba Sensorial del Jugo de Caña: Sin Tratamiento (347)

panelistas	color	Sabor	Aceptabilidad
1	1	4	2
2	2	4	3
3	1	4	2
4	2	4	2
5	3	4	3
6	2	4	2
7	2	4	2
8	1	4	2
9	1	3	3
10	1	4	2
11	1	4	2
12	2	3	2
13	2	3	3
14	2	3	2
15	2	3	2
16	1	3	3
17	1	4	2
18	1	5	2
19	2	5	2
20	3	5	2
21	2	4	3
22	2	4	2
23	1	3	2
24	1	4	1
25	2	5	1
26	1	4	1
27	1	5	1
28	2	3	2
29	2	3	2
30	1	5	2
31	1	5	1
32	2	4	2
33	2	4	2
34	1	5	2
35	1	3	2
36	1	5	2
37	2	5	2

...Continuación

38	1	4	2
39	1	3	2
40	2	4	2
41	1	4	2
42	2	4	2
43	2	5	2
44	1	4	2
45	2	4	1
46	2	3	2
47	1	4	2
48	1	5	1
49	1	3	1
50	3	3	1
51	1	4	2
52	2	4	3
53	1	4	1
54	1	4	2
55	1	3	1
56	1	3	1
57	1	3	2
58	1	5	2
59	1	3	2
60	2	4	2
61	3	3	2
62	2	2	2
63	1	3	2
64	1	5	2
65	1	4	1
66	1	3	3
67	2	3	1
68	2	3	2
69	1	4	1
70	1	4	2
71	1	4	3
72	1	3	1
73	1	3	2
74	1	3	1
75	2	3	2
76	2	4	1
77	2	4	2
78	1	4	2

...Continuación

79	1	3	1
80	1	4	2
81	1	4	2
82	1	4	2
83	1	4	1
84	2	3	3
85	1	3	3
86	1	3	1
87	1	4	3
88	2	4	1
89	1	4	1
90	1	3	1
91	1	3	2
92	1	3	2
93	2	3	2
94	2	4	2
95	1	3	1
96	1	3	2
97	2	3	2
98	1	3	1
99	1	3	1
100	1	3	2

Anexo 4

Análisis Estadístico de la Evaluación Sensorial del Sabor, Color y Aceptabilidad del Jugo de Caña

A. Prueba De Hipótesis Para el Color.

1) Planteamiento de Hipótesis

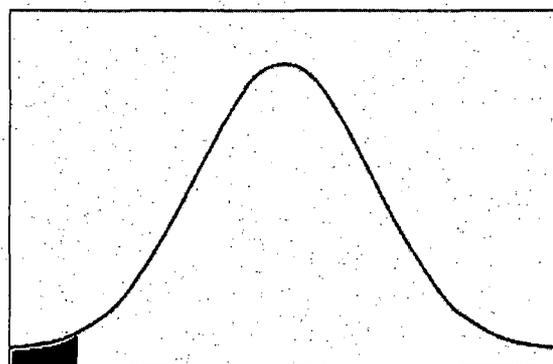
$H_0 : \mu_{mn} = \mu_{mo}$: El puntaje promedio de la evaluación del color de la muestra natural o sin tratamiento del jugo de caña es igual al puntaje promedio de la evaluación del color de la muestra optimizada.

$H_1 : \mu_{mn} < \mu_{mo}$: El puntaje promedio de la evaluación del color de la muestra natural o sin tratamiento del jugo de caña es menor que el puntaje promedio de la evaluación del color de la muestra optimizada.

mn= Muestra natural
mo = Muestra Optimizada

2) Nivel de significancia.

$$\alpha = 0.05$$



$$t = -1.72$$

3) Prueba Estadística. Se utilizó la prueba estadística de t de student para pruebas pareadas

$$t_o = \frac{\bar{d} - 0}{\sqrt{\frac{S^2}{n}}}$$

$gl = n - 1$

$$t = 0,74/0.296 = 2.49$$

- 4) **Conclusión:** como el t_{tabular} es menor que el $t_{\text{calculado}}$, entonces **no se rechaza** la hipótesis nula, por lo tanto se concluye que con un nivel de significancia del 5% que el puntaje promedio de la evaluación del Color de la muestra natural o sin tratamiento del jugo de caña es igual al puntaje promedio de la evaluación del color de la muestra optimizada

B. Prueba de Hipótesis Para el Sabor.

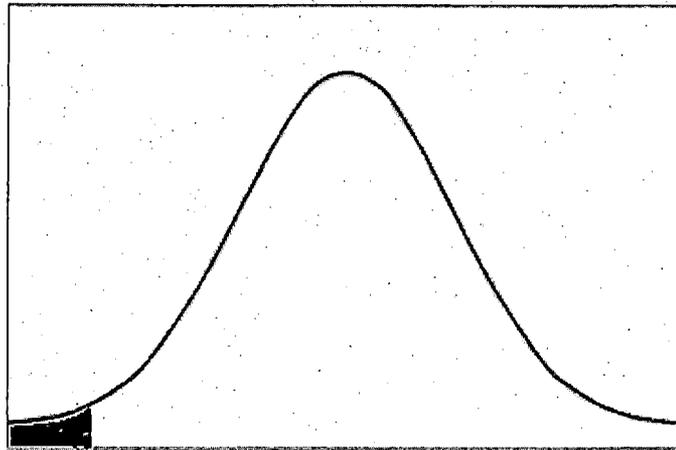
1) Planteamiento de Hipótesis

$H_0 : \mu_A = \mu_D$: El puntaje promedio de la evaluación del Sabor de la muestra natural o sin tratamiento del jugo de caña es igual al puntaje promedio de la evaluación del Sabor de la muestra optimizada.

$H_1 : \mu_A < \mu_D$: El puntaje promedio de la evaluación del Sabor de la muestra natural o sin tratamiento del jugo de caña es menor que el puntaje promedio de la evaluación del sabor de la muestra optimizada.

2) Nivel de significancia.

$$\alpha = 0.05$$



$$t = -1.72$$

3) **Prueba Estadística.** Se utilizó la prueba estadística de t de student para pruebas pareadas

$$t_o = \frac{\bar{d} - 0}{\sqrt{\frac{S^2}{n}}}$$

$gl = n - 1$

$$t = -1,09/0.66 = - 1.65$$

4) **Conclusión:** como el t_{tabular} es menor que el $t_{\text{calculado}}$, entonces **no se rechaza** la hipótesis nula por lo tanto se concluye que con un nivel de significancia del 5% el puntaje promedio de la evaluación sensorial del Sabor de la muestra natural o sin tratamiento del jugo de caña es igual al puntaje promedio de la evaluación sensorial del sabor de la muestra optimizada

C. Prueba de Hipótesis Para la Aceptabilidad

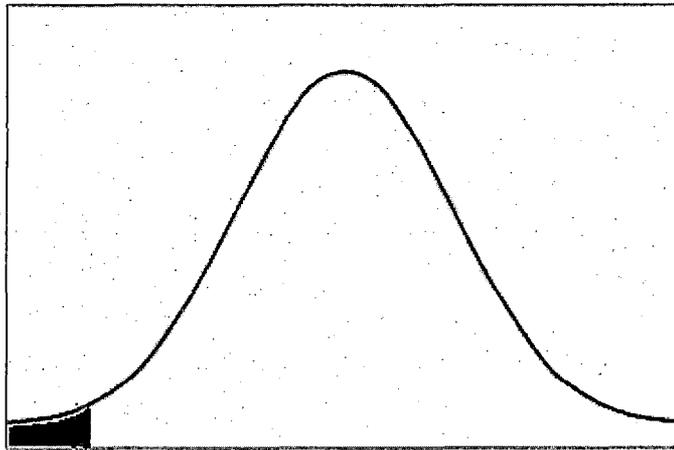
1) Planteamiento de Hipótesis

$H_0 : \mu_{mn} = \mu_{mo}$: El puntaje promedio de la evaluación de la aceptabilidad de la muestra natural o sin tratamiento del jugo de caña es igual al puntaje promedio de la evaluación de la aceptabilidad de la muestra optimizada.

$H_1 : \mu_{mn} < \mu_{mo}$: El puntaje promedio de la evaluación de la aceptabilidad de la muestra natural o sin tratamiento del jugo de caña es menor que el puntaje promedio de la evaluación de la aceptabilidad de la muestra optimizada.

2) Nivel de significancia.

$$\alpha = 0.05$$



$$t = 1.72$$

3) Prueba Estadística. Se utilizó la prueba estadística de t de student para pruebas pareadas

$$t_o = \frac{\bar{d} - 0}{\sqrt{\frac{S^2}{n}}}$$

$gl = n - 1$

$$t = -10.91/0.83 = -13.163$$

4. **Conclusión:** como el t_{tabular} es mayor que el $t_{\text{calculado}}$, entonces se rechaza la hipótesis nula por lo tanto se acepta la hipótesis alternativa, y se concluye con un nivel de significancia del 5% de que el puntaje promedio de la evaluación de la aceptabilidad de la muestra natural o sin tratamiento del jugo de caña es menor que el puntaje promedio de la evaluación de la aceptabilidad de la muestra optimizada.

Anexo 5

Lecturas de Absorción Para la Construcción del Espectro de Máxima Absorción de la Enzima de Polifenoloxidasa

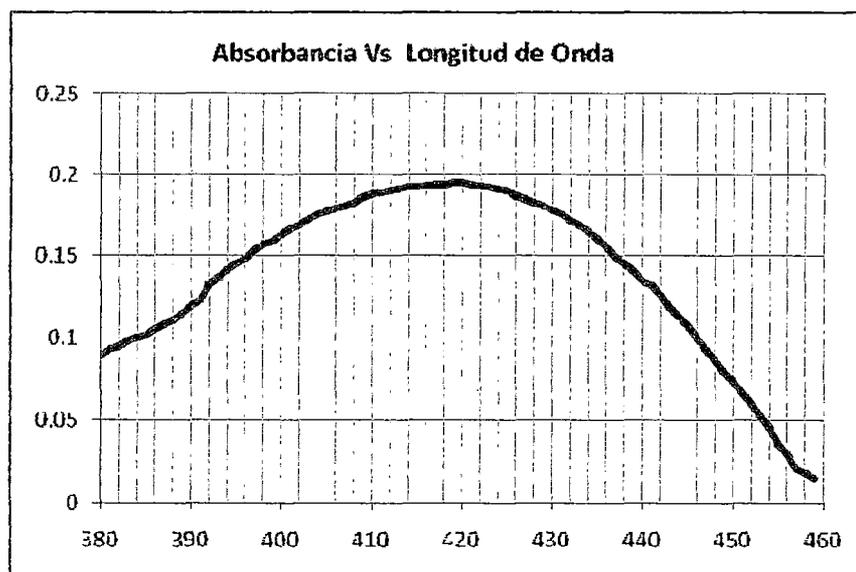
Longitud de Onda nm	Absorbancia
380	0,089
381	0,093
382	0,094
383	0,098
384	0,100
385	0,101
386	0,105
387	0,108
388	0,111
389	0,115
390	0,119
391	0,123
392	0,132
393	0,136
394	0,141
395	0,145
396	0,148
397	0,153
398	0,157
399	0,159
400	0,163
401	0,166
402	0,168
403	0,172
404	0,175
405	0,177
406	0,179
407	0,181
408	0,183
409	0,186
410	0,188
411	0,189
412	0,19
413	0,191
414	0,192
415	0,192
416	0,193
417	0,194

...Continuación

418	0,194
419	0,195
420	0,195
421	0,194
422	0,193
423	0,192
424	0,191
425	0,19
426	0,187
427	0,185
428	0,183
429	0,181
430	0,178
431	0,175
432	0,171
433	0,168
434	0,165
435	0,16
436	0,155
437	0,149
438	0,145
439	0,14
440	0,134
441	0,131
442	0,125
443	0,118
444	0,113
445	0,107
446	0,1
447	0,093
448	0,086
449	0,079
450	0,073
451	0,066
452	0,059
453	0,053
454	0,046
455	0,036
456	0,03
457	0,021
458	0,018
459	0,015
460	0,011

Anexo 6

Espectro de Máxima Absorción de la Enzima de Polifenoloxidasasa



Anexo 7

Modelo Box Behnken de los Tratamientos para la Inactivación de la Enzima Polifenoloxidasa

Nº	Concentración de Ácido Ascórbico %	Temperatura	Tiempo
1	0,1	70	4
2	0,1	80	2
3	0,1	80	6
4	0,1	90	4
5	0,15	70	2
6	0,15	70	6
7	0,15	80	4
8	0,15	80	4
9	0,15	80	4
10	0,15	90	2
11	0,15	90	6
12	0,2	70	4
13	0,2	80	2
14	0,2	80	6
15	0,2	90	4

Anexo 8

Resultados del Porcentaje de Inactivación de Polifenoloxidas Aplicando los Tratamientos en Jugo de Caña

Nº	Concentración de ácido ascórbico %	Temperatura	Tiempo	Porcentaje de inactivación
1	0,15	80	4	84,48
1	0,1	70	4	10,34
1	0,2	70	4	60,34
1	0,1	90	4	67,24
1	0,2	90	4	91,38
1	0,1	80	2	27,59
1	0,2	80	2	68,97
1	0,15	80	4	81,03
1	0,1	80	6	58,62
1	0,2	80	6	72,41
1	0,15	70	2	29,31
1	0,15	90	2	74,14
1	0,15	70	6	55,17
1	0,15	90	6	77,59
1	0,15	80	4	84,48
2	0,15	80	4	89,29
2	0,1	70	4	10,71
2	0,2	70	4	57,14
2	0,1	90	4	67,86
2	0,2	90	4	92,86
2	0,1	80	2	26,79
2	0,2	80	2	67,86
2	0,15	80	4	82,14
2	0,1	80	6	53,57
2	0,2	80	6	73,21
2	0,15	70	2	26,79
2	0,15	90	2	73,21
2	0,15	70	6	53,57
2	0,15	90	6	80,36
2	0,15	80	4	87,5
3	0,15	80	4	87,93
3	0,1	70	4	10,34
3	0,2	70	4	62,07

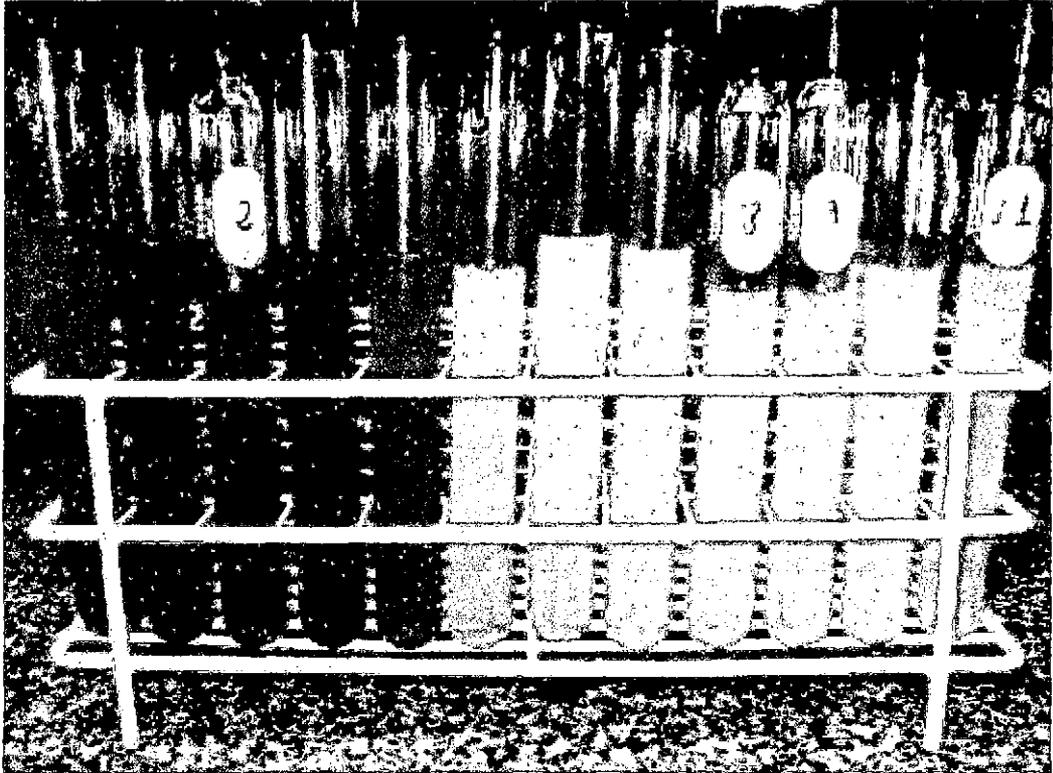
...Continuación

3	0,1	90	4	68,97
3	0,2	90	4	91,38
3	0,1	80	2	27,59
3	0,2	80	2	67,24
3	0,15	80	4	84,48
3	0,1	80	6	56,9
3	0,2	80	6	72,41
3	0,15	70	2	24,14
3	0,15	90	2	74,14
3	0,15	70	6	55,17
3	0,15	90	6	79,31
3	0,15	80	4	86,21

32041

Anexo 9

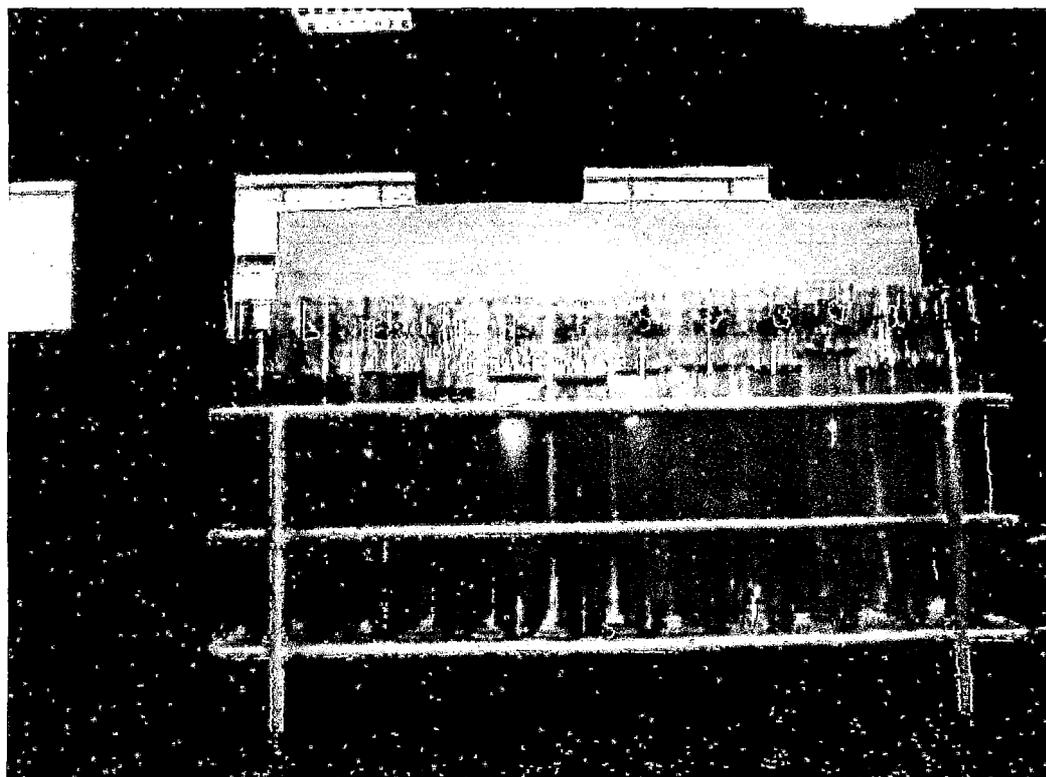
Resultados Experimentales de laboratorio: Aplicación de los Tratamientos en el Jugo de Caña Según Modelo Box Benhken



En la presente gráfico se observa las muestras después de realizado los tratamientos realizados al jugo de caña,

Anexo 10

Resultados Experimentales de Laboratorio: Extracción de la Enzima del Jugo de Caña.



En la presente gráfico se observa las muestras después de realizado los tratamientos al jugo de caña y extraída la enzima Polifenoloxidasas.

Anexo 11

Lecturas de Absorción de los Tratamientos de Jugo de caña



Anexo 12

Resultados de la Prueba T: Color del Jugo de Caña

Estadísticos de Grupo					
	Tratamiento	N	Media	Desviación típica.	Error tít. de la media
Color	tratamiento óptimo	100	3,380	0,8502	0,0850
	sin tratamiento	100	1,430	0,5730	0,0573

Anexo 13

Resultados de la Prueba T: Sabor del Jugo de Caña

Estadísticos de Grupo					
	Tratamiento	N	Media	Desviación típica.	Error típ. de la media
sabor	tratamiento óptimo	100	3,620	,6159	,0616
	sin tratamiento	100	3,710	,7148	,0715

Anexo 14

Resultados de la prueba T: Aceptabilidad del Jugo de Caña

Estadísticos de Grupo					
	Tratamiento	N	Media	Desviación típica.	Error típ. de la media
aceptabilidad	Tratamiento óptimo	100	3,580	,7808	,0781
	sin tratamiento	100	1,850	,6093	,0609