

Empleo de enzimas en bebida de almendras para mejorar su palatabilidad

María Daniela Zamacona¹, Patricia A. Della Rocca²

¹ Universidad Tecnológica Nacional, Facultad Regional Buenos Aires, Escuela de Posgrado, Castro Barros 91, (C1178AAA), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

² Universidad Tecnológica Nacional, Facultad Regional Buenos Aires, Centro de Tecnologías Químicas (CTQ), Medrano 951, (C1179AAQ), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

patriciadellarocca@hotmail.com

Recibido el 12 de marzo de 2020, aprobado el 26 de marzo de 2020

Resumen

Con intenciones de mejorar la palatabilidad y aceptabilidad de la bebida de almendras, se ensayó un tratamiento enzimático para disminuir su residuo celulósico (*chalkiness*). El tratamiento propuesto disminuye la fibra bruta, mientras que incrementa la glucosa. No se apreciaron modificaciones significativas en la reología del producto. Sin embargo, se observó una reducción significativa de los depósitos de partículas en el fondo del recipiente contenedor. Mediante un panel de consumidores (perfil Flash), se pudo confirmar la mejora en la aceptabilidad del producto.

PALABRAS CLAVE: BEBIDA DE ALMENDRAS - HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA - CHALKINESS - PERFIL FLASH - CELULOSA - FIBRA - CELULASA - PALATABILIDAD

Abstract

With the intention of improving the palatability and consumers' acceptability of almond drink, an enzymatic treatment was tested, seeking to reduce the cellulosic residue. This treatment diminishes the fiber, while increasing the glucose content. No significant changes were observed in the beverage's rheology. However, a significant reduction of particle deposits was observed at the bottom of the container. Based on a panel of consumers (Flash profile), the improvement of product acceptability could be confirmed.

KEYWORDS: ALMONDS BEVERAGE - ENZYMATIC HYDROLYSIS - CHALKINESS - FLASH PROFILE - CELLULOSE - FIBRE - CELLULASE - PALATABILITY

Introducción

El objetivo principal de este trabajo es degradar enzimáticamente la celulosa residual (polisacárido) de la bebida de almendras a carbohidratos formados por menores unidades repetitivas en su constitución como oligosacáridos y también monosacáridos como la glucosa. Los productos finales obtenidos dependen de la degradación parcial o total, respectivamente.

La celulosa aporta a la bebida una textura áspera y algo de sabor amargo. Además, en el envase sedimenta una gran cantidad de partículas celulósicas. Por ello, la necesidad de disminuir su contenido para mejorar la palatabilidad.

La celulosa, componente principal de la pared celular de los tejidos vegetales, es el biopolímero más abundante en la naturaleza. Se puede degradar por algunos microorganismos

tales como bacterias, protozoos y ciertos hongos filamentosos (Marquina, 2005). La celulosa funciona en la mayoría de los vegetales como una barrera estructural que limita la liberación de componentes de sabor o de interés para la industria alimenticia (Rastogi *et al.* 1998; Sarker *et al.* 1999; Lee *et al.* 2005). Este polisacárido está formado por unidades de glucosa, las cuales se mantienen unidas mediante enlaces β -1,4 glicosídicos. Dependiendo de la fuente, puede tener entre 8.000 y 15.000 unidades monoméricas por cadena. La Figura 1 presenta la estructura química de la celulosa.

Las cadenas de celulosa pueden unirse entre sí por uniones puentes de hidrógeno. Asimismo, pueden aparecer uniones puente de hidrógeno intramoleculares. Estas uniones pueden apreciarse en la Figura 2, con líneas de trazos.

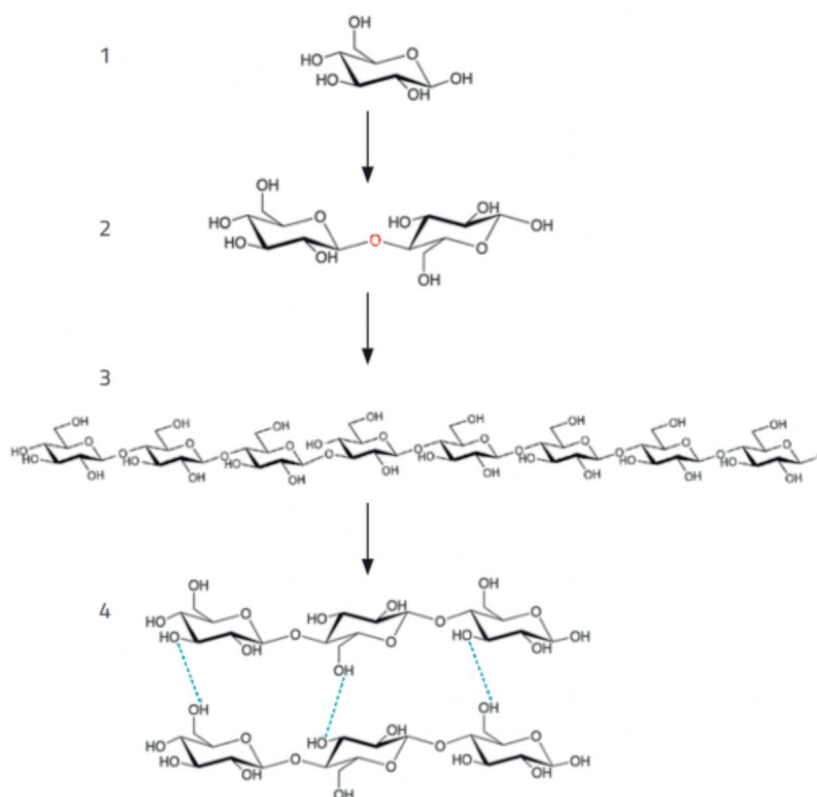


Fig. 1. Estructura química de la celulosa, formada por moléculas de glucosa. 1: molécula de glucosa; 2: celobiosa (dos moléculas de glucosa unidas a través de un enlace glicosídico β -1,4); 3: cadena de glucano; 4: parte de una macromolécula de celulosa mostrando los enlaces de hidrógeno que unen las cadenas de glucanos. (Adaptado de Worthington-biochem.com, megazyme.com)

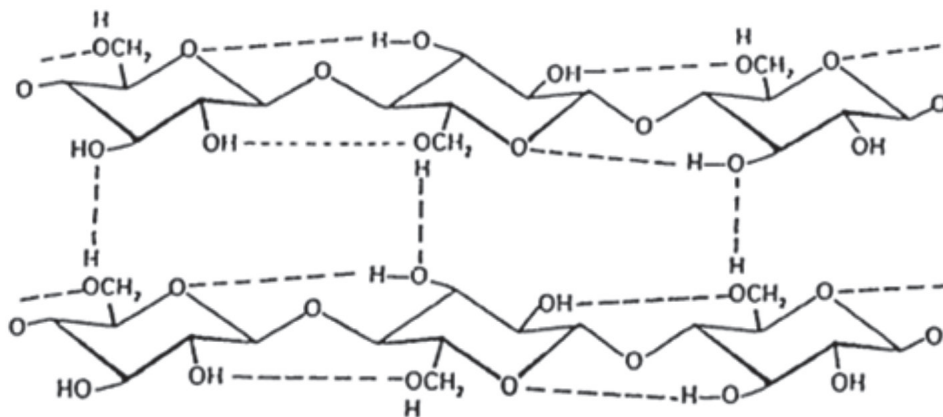


Fig. 2. Uniones puente de hidrógeno intra e intermoleculares (líneas de trazos)

El polisacárido está localizado en la pared celular, donde se encuentra como unidades submicroscópicas de forma alargada llamadas micelas. Estas micelas se organizan en estructuras más grandes, las microfibrillas, las cuales se empaquetan formando una estructura cristalina altamente ordenada. Esta estructura se encuentra rodeada por polisacáridos hemicelulósicos que se unen a la celulosa por puentes de hidrógeno y enlaces covalentes, haciéndola aún más resistente a la hidrólisis química y biológica. No toda la estructura de la celulosa es cristalina, existen regiones desordenadas, denominadas regiones amorfas, con una composición heterogénea. La Figura 3 presenta un esquema de la estructura de la pared celular.

Las celulasas (E.C.3.2.1.4) promueven la hidrólisis de la celulosa. Estas enzimas son biocatalizadores altamente específicos que actúan sinérgicamente para liberar las unidades o grupo de unidades. El sistema de celulosa típico incluye tres tipos de enzimas: la endo- β -1,4-glucanasa (Cx) (1,4- β -D-glucan glucanohidrolasa E.C.3.2.1.4), la exo- β -1,4-glucanasa (C1) (1,4- β -D-glucan celobiohidrolasa E.C.3.2.1.91) y la β -1,4-glucosidasa (celobiasa) (Cb) (β -D-glucósido glucohidrolasa E.C.3.2.1.21). En la literatura, el mecanismo propuesto para la degradación de la celulosa consta de tres etapas. La primera involucra a la endo- β -1,4-glucanasa que actúa al azar sobre los enlaces β -1,4 glucosídicos internos de la celulosa, y convierte

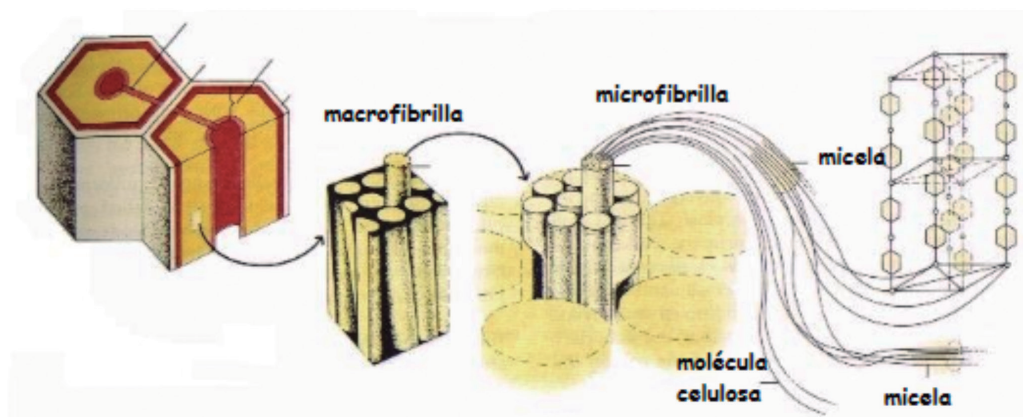


Fig. 3. Esquema de la estructura de la pared celular en la que se puede apreciar las macrofibrillas, microfibrillas y micelas de la celulosa

las cadenas largas a oligosacáridos, los cuales mantienen la configuración β de su estructura. La acción de esta enzima es sobre las regiones amorfas de la molécula de celulosa o sobre la superficie de las microfibrillas, y tiene como resultado la disminución de la longitud de la cadena de celulosa y la creación de nuevos extremos reactivos que sirven de sustrato para la posterior acción de la enzima exo β -1,4-glucanasa. En la segunda etapa actúa la exo β -1,4- glucanasa, la cual es una enzima que corta la cadena 1,4 β -D-glucano a partir del extremo no reductor de la molécula de celulosa y de las celodextrinas, lo que produce la eliminación de las unidades de celobiosa o glucosa. Ambas enzimas endoglucanasa y exoglucanasa son inhibidas por uno de los productos de la hidrólisis enzimática, la celobiosa, razón por la que se disminuye la eficiencia de la hidrólisis. Una vez degradada las zonas amorfas de la celulosa, tiene lugar la hidrólisis de la región cristalina, como resultado de la acción sinérgica de la endoglucanasa y la exoglucanasa (Beldman *et al.* 1988). Finalmente, una etapa que limita la degradación de la celulosa es la hidrólisis de la celobiosa a glucosa mediante la acción de la β -1,4- glucosidasa Cb, porque las glucanasas son inhibidas por la celobiosa (Ovando Chacón & Waliszewski, 2005).

Las principales preparaciones comerciales de celulasas se obtienen de hongos filamentosos

(*Trichoderma reesei* y *Aspergillus niger*). Las celulasas se utilizan en la industria de bebidas para la producción de zumos de frutas y el procesamiento del vino. Facilitan la extracción de jugos y la maceración para la producción de néctares de frutas al romper las cadenas de celulosa que ayudan a retener el líquido en las células de la planta. Además, así se liberan las sustancias aromatizantes y, de esta forma mejora el aroma y el sabor de las bebidas preparadas biotecnológicamente.

Almendra

La almendra es el núcleo comestible y "leñoso" de la drupa que crece en la copa de los almendros (*Prunus Dulcis*) originarios de la región de Asia Central. (Martínez-Gómez *et al.* 2007). Los almendros, son árboles medianos actualmente plantados en climas mediterráneos como California, España, Italia y algunas zonas de Australia.

Existen una infinidad de variedades que se dividen en dos grandes grupos: "cáscara blanda" y "cáscara dura".

En la Tabla 1 se presentan las variedades que resultan de interés para la Argentina.

En la Figura 4 se pueden apreciar la forma y aspecto de los frutos de algunas variedades

Tabla 1. Variedades de floración tardía

Variedad	Origen	Floración	Cáscara	Rendimiento (%)	Autogamia
Ferragnes	Francia	tardía	dura	37-40	no
Ferraduel	Francia	tardía	muy dura	27-29	no
Guara	España	tardía	dura	32-35	si
Ayles	España	tardía	dura	30-34	si
Tuono	Italia	tardía	muy dura	33-35	si
Moncayo	España	muy tardía	muy dura	25-28	si
Aï	Francia	tardía	semidura	40-42	no
Cristomorto	Italia	tardía	muy dura	23-27	no
Felisa	España	muy tardía	dura	34-36	si
Francolí	España	tardía	dura	30-32	no
Masbovera	España	dura	muy dura	28-30	no
Ruby	EEUU	tardía	blanda	52-55	no
Yaltinsky	Rusia	tardía	blanda	44-50	no



Fig. 4. Variedades de almendras

Fuente: Montoro, 2020

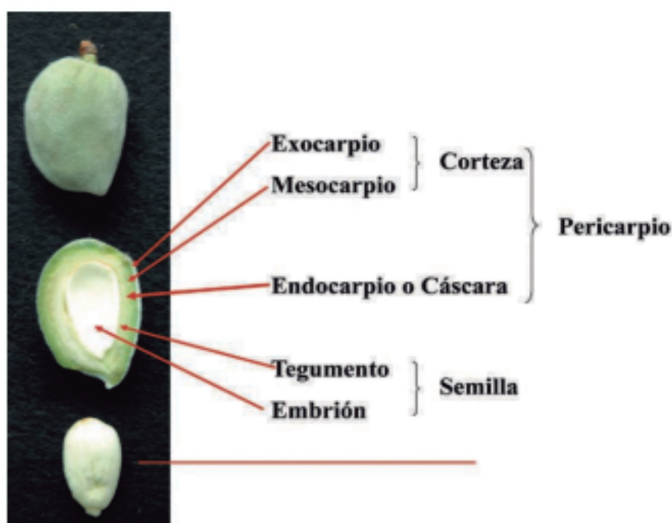


Fig. 5. Partes del fruto

Fuente: Arquero, 2013

En la actualidad, desarrollos genéticos de empresas privadas como Burchell Nursery están introduciendo otras nuevas variedades como Shasta ® e Independence ® cuya ventaja es la capacidad de polinización intra-varietal (Ewing & Soares, 2018) (Burchell Nursery, 2018). La importancia del tipo de floración reside en hecho de que el almendro florece los

primeros días templados del fin del invierno. En Argentina lo hace entre fines de julio y mitad de septiembre. (Iannmico, 2012).

En la Figura 5 se pueden apreciar las partes del fruto.

El núcleo comestible es la semilla.

Las almendras son una excelente fuente de energía, y de nutrientes importantes como el contenido de aceites oleicos y linoleicos, así como minerales (Na, Ca, Zn, Fe), proteínas y algunas vitaminas (principalmente A, D, E y B12).

Las industrias preparan la bebida a partir de la adquisición de una pasta de almendra pelada y blanqueada. Mientras que los elaboradores artesanales, producen la bebida a partir de la almendra entera.

Producción mundial

En la última década la producción mundial de almendras ha aumentado más de un 40%, y el incremento es veloz ya que el almendro se caracteriza por ser un árbol muy precoz. En el primer año ya presenta yemas fructíferas que comienzan a producir al segundo año. Con un buen manejo puede obtenerse la primera cosecha comercial al tercer año. Luego, para aumentar la productividad se incrementa la densidad de plantas hasta el séptimo año cuando se logra plena producción.

En el período 2018-2019, Estados Unidos encabezó la lista de países productores con 1 millón de toneladas, seguido por Australia,

con 80 mil toneladas, España, con 61 mil toneladas y Túnez, con 16 mil toneladas e Irán, con 15 mil toneladas. (International Nut and Dried Fruit Council, 2019). En la Figura 6 se presenta la evolución de la producción mundial de almendras desde el período (2008/2009) hasta el (2018/2019) en el que se incrementó en un 42,6 %.

Producción en Argentina

La superficie cultivada en nuestro país tuvo un fuerte decrecimiento en la década de 1990 por la enérgica competencia de almendras chilenas y españolas. Otro factor que contribuyó fue la existencia de un gran porcentaje de variedades de floración temprana, que frecuentemente se destruyen total o parcialmente por las heladas primaverales. En los últimos años, se realizaron nuevas plantaciones con una selección de variedades de floración tardía. En la actualidad Mendoza posee la mayor superficie plantada. La Tabla 2 presenta la distribución por provincia.

Método de producción de la bebida de almendras

La bebida de almendra es una dispersión coloidal de agua y almendras en pasta o en polvo. Por lo

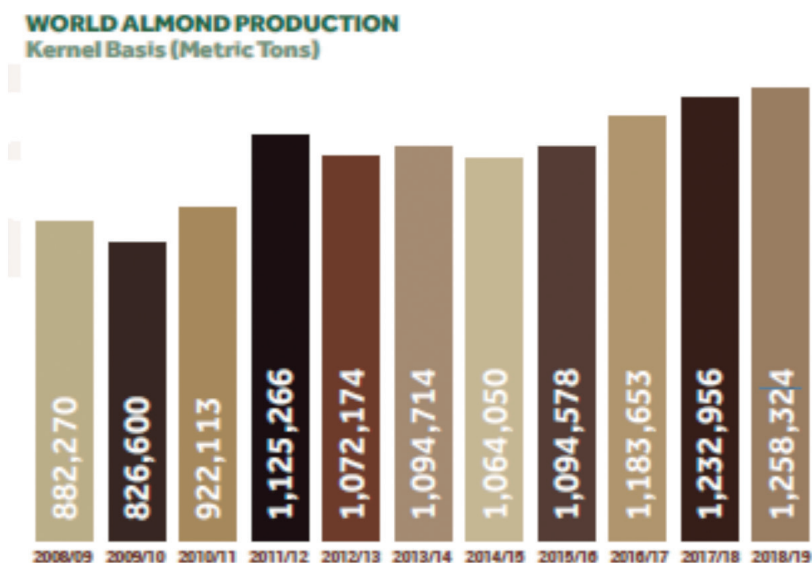


Fig. 6. Evolución de la producción mundial de almendras
Fuente: International Nut and Dried Fruit Council, 2019

Tabla 2. Hectáreas plantadas en provincias argentinas

Fuente: Iannamico, Cultivo del almendro, 2015

Provincia	Sup. (Ha)
Mendoza	2.580
San Juan	572
La Rioja	498
Salta	189
Río Negro-Neuquén	170
Otras	200
Total	4.199

tanto, cuando la bebida se produce a partir de la almendra completa se requiere blanqueado y molienda, de lo contrario, se debe adquirir directamente la pasta. En la Tabla 3 se pueden apreciar todos los ingredientes de una receta típica con sus respectivas proporciones.

Para evitar la separación en fases, se utilizan los estabilizantes. Además, éstos le otorgan una mayor consistencia similar a la leche de vaca. Los estabilizantes más elegidos son la carragenina,

la goma gellan, la goma xántica y la goma guar.

En las instalaciones típicas de una planta se mezcla el agua y la pasta en una tolva en la que se puede agregar también la enzima, sin necesidad de equipos adicionales. Se deberá mantener la bebida durante el tiempo requerido y también a la temperatura deseada para que ocurra la hidrólisis de manera adecuada. Posteriormente, el tratamiento térmico (Ultra alta temperatura (UAT) o pasteurización) inactivará la enzima.

Tabla 3. Ingredientes de una receta típica de bebida de almendras

Ingrediente / Proporción (m/m)		Función
Agua	93,0%	
Pasta de almendras	2,5%	
Azúcares (opcional)	2,0%	
Lecitina de soja	0,1%	Emulsificante
Mezcla comercial de emulsificante/estabilizante Ejemplo: mezclas de monodiglicéridos, goma guar, carragenina y/o monoésteres de glicerol.	0,1%	Emulsificante / estabilizante
Maltodextrina	2,0%	Edulcorante, estabilizante
Carbonato de calcio	0,2%	Fortificación con calcio
Sal	0,1%	Resaltador del sabor
Esencia de vainilla	0,1%	Saborizante

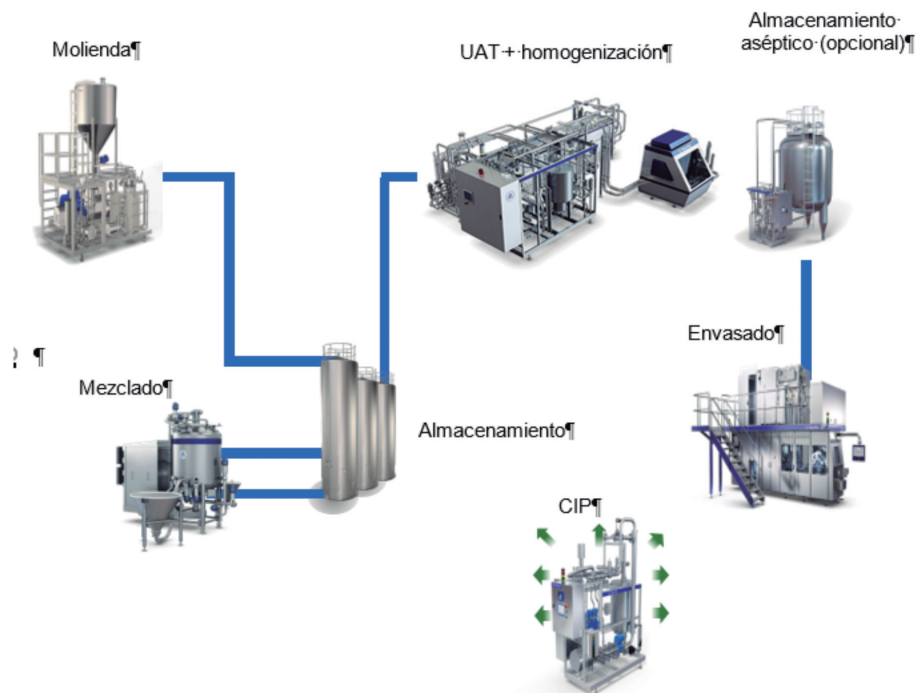


Fig. 7. Esquema de equipos para producción de bebida de almendras

En el caso de que se desee un producto comercialmente estéril, se deberá realizar un proceso UAT, normalmente con homogeneización integrada al mismo, y luego envasado aséptico. El producto tratado de esta forma, puede ser distribuido y comercializado a temperatura ambiente. De lo contrario, se realiza la pasteurización (también con homogeneización integrada), envasado y distribución y comercialización refrigerados.

Como se trata un producto de baja acidez, normalmente se aplican las mismas combinaciones de tiempo y temperatura que para leche bovina, es decir:

UAT: 4 segundos a 138-140 °C y Pasteurización: 20 segundos a 72 °C.

En la Figura 7 se presenta el esquema ilustrativo de las instalaciones típicas de una fábrica de elaboración de bebida de almendras (UAT):

Empleo de enzimas en la industria de bebidas

La producción de bebidas emplea herramientas biotecnológicas hace cientos de años. El uso de enzimas y microorganismos empezó a explotarse empíricamente, para convertirse

hoy en un día en una especialidad técnica de gran importancia económica. Actualmente se hacen screening de microorganismos para seleccionar a los más adecuados, se aprovechan mutaciones e ingeniería genética, se inmovilizan enzimas, se producen complejos enzimáticos específicos, etc. Algunos ejemplos actuales son el uso de lactasa en la industria láctea, la clarificación de jugos y vinos mediante pectinasas y celulasas, la manipulación genética de la levadura para cervecera y viticultura (Cantarelli & Lanzarini, 1989).

Parte experimental

Materiales

- Complejo enzimático Rapidase Extra Color[®] de Oenobrand (una compañía de DSM Food Specialties y Anchor Yeast) compuesto de pectinasas, celulasas y hemicelulasas. Este insumo, es importado y ampliamente empleado en la industria vitivinícola en la región de Cuyo, Argentina.

- Kit Glicemia enzimática AA de laboratorios Wiener.

- Bebida de almendras.

La bebida de almendras empleada se elaboró a partir de almendras enteras (no pasta), y se pasteurizó (homogeneización integrada). Presenta un pH de 5,75 (a 15°C) y una densidad de 1,02 g/ml (a 15°C). Sus datos nutricionales se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. Tabla de datos nutricionales

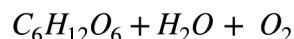
	Por 200 ml	
Valor energético	48	kcal
Carbohidratos	2	g
Proteínas	2	g
Grasas totales	4	g
Grasas saturadas	0,3	g
Grasas trans	0	g
Fibra alimentaria	1	g
Sodio	40	mg

Métodos

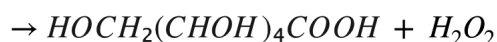
Hidrólisis de la celulosa a diferentes dosis de enzima y temperatura

Se realizaron ensayos a distintas concentraciones y temperaturas. Se emplearon las siguientes dosis de enzimas: 1, 2, 3, 4 y 5 gramos de complejo enzimático por litro de bebida. El rango de temperatura recomendado para el uso de la enzima es de 10-50°C. La temperatura de inactivación es de 50°C, según el fabricante. El seguimiento de la hidrólisis se pudo realizar construyendo una curva de evolución de glucosa producida por esta reacción a temperatura de 32 °C. La medición de la glucosa se puede realizar mediante el método de la glucosa oxidasa que cataliza la formación de ácido glucó-

nico, con liberación de peróxido de hidrógeno. El ácido glucónico (pentahidroxicaproico) es el producto de oxidación de la D-glucosa en el carbono 1.

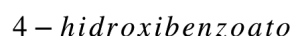
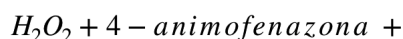


GOD



GOD: enzima glucosa oxidasa

El peróxido a su vez reacciona con 4-aminofenazona y 4-hidroxibenzoato formando quinonimina roja, cuya coloración puede cuantificarse mediante la absorbancia a 550 nm mediante espectrofotometría.



POD → quinonimina roja

POD: enzima preoxidasa

Para llevar a cabo este método se aplica una muestra sobre una cubeta preparada con kit reactivo, conformado por los elementos de la Tabla 5.

El valor de absorbancia obtenido se contrasta con el valor de la solución estándar (concentración conocida de glucosa 100 mg/dl, 1 g/l).

Cuantificación de la concentración de fibra en bebida de almendras, antes y después del tratamiento enzimático

El principal objetivo de la hidrólisis es reducir la cantidad de celulosa, y no exactamente generar glucosa, que solo se logra si la hidrólisis es

Tabla 5. Conformación de kit para medición de glucosa

Compuesto (origen)	Concentración
GOD (microbiana)	≥ 10 kU/l
POD (rábano)	≥ 1 kU/l
4-Animofenazona	0,5 mmol/l
Fosfatos (búffer pH 7)	100mmol/l
Hidroxibenzoato	12 mmol/l

total. Para verificar la hidrólisis parcial alcanzada, se realizaron análisis de fibra bruta del producto tratado a distintas concentraciones de complejo enzimático.

El método empleado fue AOAC 17a Ed. 978.10 basado en digestión ácida y alcalina. La fibra bruta medida por este método consiste en celulosa, principalmente. Por lo tanto, el valor diferencial de fibra bruta entre muestras tratadas y no tratadas corresponderá a la celulosa que (independientemente de alcanzar o no hidrólisis total a glucosa) alcanzó a transformarse y dejó de ser celulosa.

Reología

Se empleó un reómetro Discovery HR-2 de placa y cono (ángulo 2°) y 40 mm de diámetro para caracterizar el comportamiento reológico de las muestras con (D y E) y sin tratamiento enzimático (A). Los datos experimentales obtenidos del esfuerzo de corte en función del gradiente de velocidad se graficaron y se aplicaron los modelos matemáticos de la ley de la potencia o de Ostwald de Waele (ecuación 1) y Herschel-Bulkley (ecuación 2).

$$\sigma = K \gamma^n \quad (1)$$

$$\sigma = \sigma_y + K \gamma^n \quad (2)$$

donde σ_y es el esfuerzo umbral, K el índice de consistencia, n el índice de comportamiento al flujo y γ el gradiente de velocidad a un esfuerzo cortante dado.

La placa Peltier se ajustó a 25°C y se realizaron curvas de esfuerzo (σ) según velocidad de cizallamiento ($1/\gamma$).

Los resultados obtenidos para las distintas muestras fueron sometidos a un test estadístico para determinar si eran o no significativamente diferentes. Se empleó el método ANOVA seguido del test de Tukey o Dunnett.

Evaluar las diferencias sensoriales entre las muestras con y sin tratamiento enzimático

Antes de realizar el análisis sensorial, se inactivó la enzima mediante el proceso de pasteu-

rización a 72 °C durante 20 segundos.

Los consumidores participaron de un perfil Flash, donde cada uno de ellos empleó sus propias palabras al describir las muestras de alimento. De esta manera, se reduce la inversión en tiempo y costo ya que no se requirieron sesiones previas de entrenamiento de expertos (Puma Isuiza & Núñez Saavedra, 2018).

A pesar de ser un método relativamente nuevo, existen ya varios antecedentes exitosos para salsa de hongos, mermeladas, yogur, salchichas, camarón ahumado, etc. (Silva Paz *et al.* 2016).

Los resultados multivariantes de un perfil Flash requieren un estudio estadístico complejo, llamado análisis de Procrustes generalizado (GPA). La información inicial para la aplicación de esta técnica está constituida por tablas de datos conformadas por filas (los consumidores) y columnas (los descriptores). Luego, se aplica el método iterativo para eliminar variabilidades entre los resultados empleando translación, escalado y rotación/reflexión, logrando para cada muestra un valor de consenso de los respectivos atributos que los consumidores hayan empleado al describir las muestras (Pastor *et al.* 1997).

Una iteración se completa, una vez que todas las configuraciones se han transformado. La configuración consenso es calculada como la media de todas las configuraciones individuales transformadas y se inicia una nueva iteración. El proceso se repite hasta que el cambio entre dos pasos consecutivos en las sumas de cuadrados residuales sea menor que un valor prefijado, generalmente se acepta 0,0001 (Del Médico & Vitelleschi, 2015). En este caso, las iteraciones se realizaron mediante el software XLSTAT 2019.3.3 versión de prueba (Addinsoft, New York, NY, USA) y se permitió una tolerancia de 0,00001.

Los valores consenso obtenidos, son puntos que se ubican en un espacio de N dimensiones, llamadas componentes principales. Por cuestiones prácticas, estas N dimensiones a considerar suelen ser dos o tres.

Las N componentes principales, resumen información de todos los descriptores que los consumidores hayan empleado pero en menor canti-

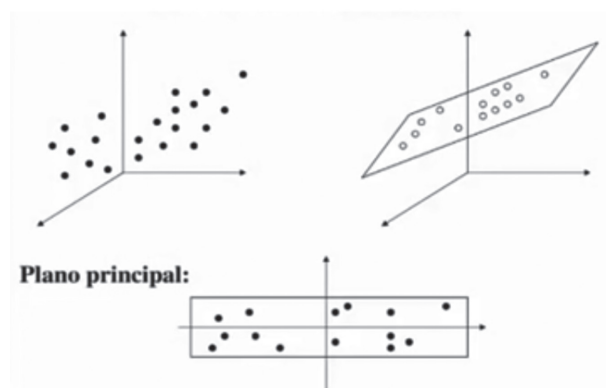


Fig. 8. Componentes principales

Fuente: Ríos Herrera, 2018

dad de dimensiones. En la Figura 8 se muestra gráficamente, cómo se puede seleccionar un plano (dos dimensiones) que contenga la mayor cantidad de información respecto a la distribución de los puntos en el espacio tridimensional.

Evaluar las diferencias en sedimentación de partículas de las muestras con y sin tratamiento enzimático

Se colocaron las muestras (tratadas con enzima (D y E) y sin tratar (A)) en la centrifuga. Se observaron los sedimentos obtenidos y se compararon cualitativamente.

Resultados y discusión

Hidrólisis: Efectos de la concentración de enzima

Las 5 muestras tratadas (B, C, D, E y F, de 1, 2, 3, 4 y 5 g/L de enzima, respectivamente) así como la muestra sin tratar (A) se mantuvieron agitadas en el agitador orbital termostatzadas para alcanzar una temperatura de 32°C en la bebida.

La muestra con la máxima concentración de enzima F (5 g/L) resultó muy difícil de disolver debido a la formación de grumos. El resto de

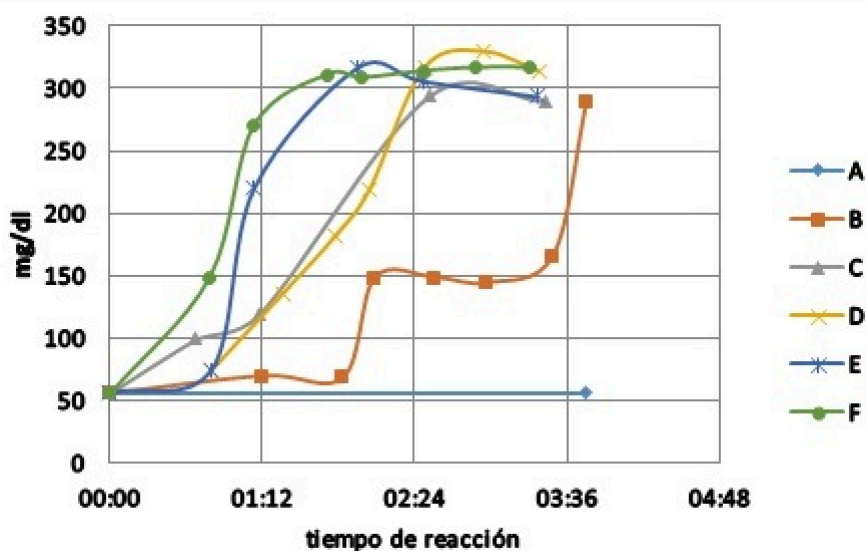


Fig. 9. Evolución de la glucosa (mg/dl) según dosis de enzima REC a 32°C

las dosis resultaron fácilmente solubles con una agitación ligera.

Los resultados del seguimiento de la reacción de hidrólisis de celulosa mediante espectrofotometría para cada una de las muestras con diferentes dosis de enzimas se puede apreciar en las curvas graficadas en la Figura 9 en la que se graficó la concentración de glucosa con el tiempo de reacción.

Con todas las dosis se obtuvo un valor final similar en el rango de 290 a 317 mg/dl de glucosa, siendo alcanzado en un tiempo de aproximadamente 4 horas con la dosis menor (B – 1 g/l) y en 1 hora 40 minutos con la dosis mayor (F – 5 g/l).

Reducción de fibra bruta a causa de la hidrólisis

Las muestras tratadas a 32°C (A-F), luego de realizada la hidrólisis fueron sometidas al ensayo de determinación de fibra bruta (AOAC 17a Ed. 978.10). Los resultados se presentan en la Tabla 6.

Para cada dosis de enzima se obtuvieron distintos valores de fibra bruta, siendo significativamente bajo en las muestras D, E y F, que tenían mayores concentraciones de la enzima.

Pero debido a que para la dosis F (5 g/L) resultó difícil de disolver y que no se lograron resultados significativamente diferentes res-

Tabla 6. Contenido de fibra bruta según dosis de enzimas

Muestra/Dosis	Fibra bruta (%m/m)
A (0 g/L.)	0,6
B (1 g/L.)	0,7
C (2 g/L.)	0,5
D (3 g/L.)	0,3
E (4 g/L.)	<0,1
F (5 g/L.)	0,1

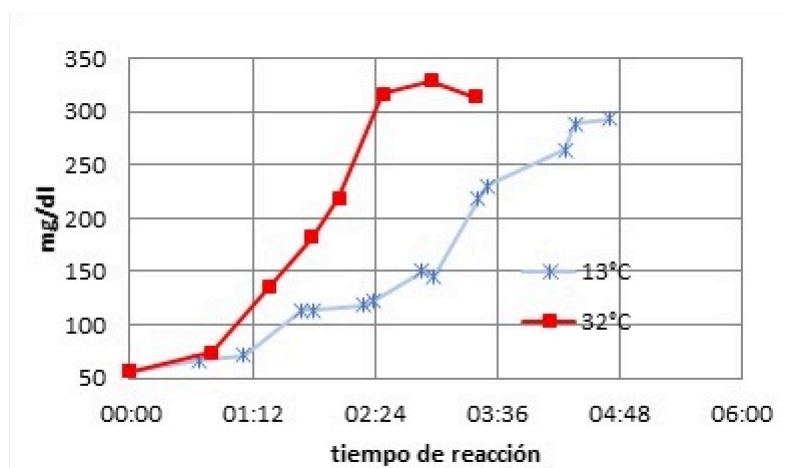


Fig. 10. Evolución de la formación de glucosa para la muestra D con una dosis de REC = 3 g/L y diferentes temperaturas (32°C y 13°C)

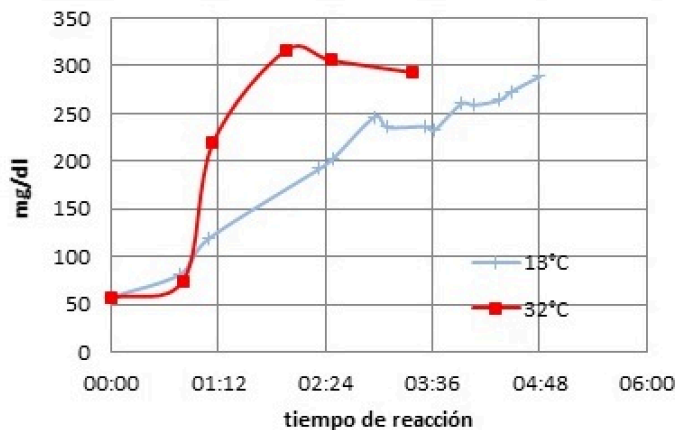


Fig. 11. Evolución de la formación de glucosa para la muestra de E con una dosis de REC = 4 g/L y a diferentes temperaturas (32°C y 13°C)



Fig. 12. Cubetas A, D y E con hidrólisis avanzada

pecto a E, ni en formación de glucosa, ni en la eliminación de fibra, se decidió descartar esta concentración para futuros ensayos.

Tras los resultados de la cuantificación de fibra y debido a que el objetivo principal es reducir el contenido de celulosa, las concentraciones D (3 g/L) y E (4 g/L) con menores contenidos de fibra fueron seleccionadas para posteriores estudios.

Hidrólisis: Análisis del efecto de la temperatura

Considerando que en la industria alimenticia se prefiere evitar procesos donde el alimento permanezca por lapsos prolongados en el rango de temperatura de los microorganismos mesófilos (20 °C-45°C), se repitió el ensayo de hidrólisis a 13°C para las dosis de enzimas D (3 g/L) y E (4 g/L). En las Figuras 10 y 11 se representan la concentración de glucosa en función del tiempo para las diferentes dosis de enzima correspondientes a las muestras D y E, respectivamente

a diferentes temperaturas (13 y 32°C).

En ambos casos (muestra D y E) se observa que se alcanzan similares valores finales entre 289-294 mg/dl aunque el tiempo necesario resulta más prolongado (aproximadamente 5 horas) para la temperatura de 13 °C.

El incremento de glucosa se puede apreciar fácilmente por la coloración de las cubetas. La Figura 12 muestra las cubetas preparadas para una etapa inicial y final de la reacción de hidrólisis.

A mayor dosis de enzima (4 g/L) en E se puede apreciar una coloración rosada más intensa que se condice con una mayor formación de glucosa, debida a una mayor degradación de la celulosa.

Comportamiento reológico de las muestras

La viscosidad podría tener un efecto directo sobre la percepción sensorial del *chalkiness*.

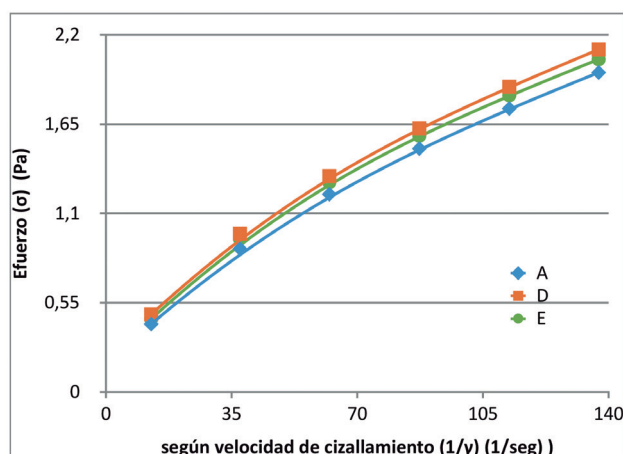


Fig. 13. Curva de esfuerzo de corte en función de la velocidad de cizallamiento, muestras A, D y E

Se podría deducir que, a igual distribución y tamaño de partículas, se percibirá menos arenoso mientras más viscoso (Kokini, 1987).

El comportamiento reológico de la bebida de almendras resultó representado satisfactoriamente mediante el modelo de Herschel-Bulkley.

En todos los casos se obtuvo un $n < 1$, evidenciando un comportamiento de fluido pseudoplástico. No se apreciaron diferencias entre las muestras A (sin tratar) y D, E (tratadas enzimáticamente).

Las mediciones tuvieron que ser repetidas en reiteradas ocasiones, debido al eventual posicionamiento de alguna partícula sólida bajo el cono del reómetro. Finalmente, se logró obtener las siguientes curvas de esfuerzo de corte en función de la velocidad de cizallamiento para las diferentes muestras A, D y E (Figura 13):

La aplicación propia del reómetro (TRIOS® TA Instruments–Waters LLC) arroja la parametrización según el modelo de Herschel-Bulkey, con

un $R^2 > 0,99$ en los tres casos. Los parámetros se presentan en la Tabla 7.

Para cada uno de los tres parámetros de Herschel-Bulkey se realizó ANOVA seguido del test de Tukey y el test de Dunnett mediante el software XLSTAT 2019.3.3 versión de prueba (Addinsoft, New York, NY, USA). Ambos métodos confirmaron que, con un intervalo de confianza del 95%, se puede afirmar que las tres muestras son iguales desde el punto de vista reológico. Por consiguiente, el tratamiento enzimático no afectó el comportamiento reológico de la bebida vegetal. Cabe resaltar, que en el reómetro no se puede colocar material particulado del fondo. El análisis se hizo de la parte líquida en todos los casos.

Análisis sensorial

Una vez confirmada la efectividad de la inactivación del coadyuvante tanto por la información teórica como por ensayo de seguimiento de glucosa, la bebida resultó entonces segura para ser ingerida por el panel de consumidores.

Tabla 7. Parámetros de Herschel-Bulkey para las muestras A, D y E

Muestra	σ_y (Pa)	n	K (Pa. s)
A	-0,14	0,56	0,14
D	-0,15	0,53	0,16
E	-0,20	0,52	0,18

Tabla 8. Muestras presentadas al panel de consumidores

Muestra	Numeración	Agregado	Procesos posteriores
A	348	Ninguno	Tratamiento térmico
MH	652	2,68 g/l de sacarosa	Tratamiento térmico
TH	188	5,36 g/l de sacarosa	Tratamiento térmico
D	107	3g/L de REC	Tratamiento térmico
E	676	4 g/L de REC	Tratamiento térmico

Se prepararon 5 muestras y se identificaron con números de tres dígitos establecidos al azar. En la Tabla 8 se describe cada una de las bebidas preparadas.

Siendo:

A: muestra de bebida natural, sin agregados

D y E: muestras con las dosis de enzima previamente estipuladas

MH y TH muestras con sacarosa agregada, emulando el poder edulcorante para la hidrólisis total de la mitad de la celulosa a glucosa y para el total respectivamente (MH y TH).

Después de 6 horas de hidrólisis, las muestras con dosis E y D fueron inactivadas por el método previamente descrito. Las tres muestras restantes también fueron tratadas por el mismo procedimiento térmico, únicamente a fines de igualar eventuales cambios de color y/o sabor debidos a la pasteurización.

Al día siguiente, se presentaron las muestras a un panel de consumidores. Entre las 9.30 am y 11 am se llamaron a 32 personas en grupos de 8, a una sala acondicionada a 24°C y bebida conservada a aproximadamente 18°C. Para la primera sesión se dedicaron 20 minutos por grupo.

A cada consumidor se le presentaron las 5 muestras, un formulario y un vaso de agua. Las muestras se presentaron en vasitos de 50 ml, sirviendo aproximadamente 20 ml.

En la primera sesión, los consumidores listaron descriptores de sabor, textura y color con sus propias palabras.

La segunda sesión fue individual y tomo 5 minutos por persona. En cada listado individual se ayudó al consumidor a eliminar repeticiones (arenoso y granuloso) o antónimos (suave y áspero). Finalmente, cada consumidor desarrolló entonces una lista propia de 3 a 7 atributos, donde en la tercera sesión, ordenó de 1 a 5 las muestras por intensidad de dichos descriptores. Cabe resaltar que se permitieron empates entre descriptores.

28 personas completaron las 3 sesiones. Los 28 consumidores reportaron un total de 110 atributos, algunos de ellos muy repetidos como se ve en la Tabla 9. Mientras que otros 18 atributos fueron mencionados por solo uno o dos consumidores y no fueron considerados para el análisis (ejemplo: aceitoso, picante o tostado).

Al permitir que cada consumidor empleara sus propias palabras, los 92 atributos restantes estaban descriptos con diversos vocablos, pero pueden normalizarse en 11 descriptores.

En algunos casos el texto libre se indica con “(-)”, haciendo referencia a que la secuencia de calificación de 1 a 5 del consumidor se invirtió para el atributo normalizado. Durante el tratamiento de datos, por ejemplo, para “dulzor” se invirtió la secuencia de ordenamiento de quienes juzgaron por “amargor”.

Algunos atributos resultan de mayor interés (+) para este trabajo como ser dulzor, granuloso y aceptabilidad, en menor medida también espesor, particulado y sabor a papel ya que podrían afectar la aceptabilidad.

Los datos colectados fueron trasladados a planillas de cálculo y procesados mediante el software XLSTAT. Se aplicó el Análisis Procrustes Generalizado que permitió identificar los componentes principales y luego la ubicación consenso de cada muestra en referencia a dichos componentes principales.

Los 6 atributos del estudio, podrían resumirse en 4 dimensiones sin perder información, siendo las dimensiones F1, F2 y F3 la de especial interés por resumir el 96% de la información.

En la Tabla 10 se indica el valor propio de cada dimensión y el porcentaje de la variabilidad total de la información que representa. Al representar más de una dimensión, la información disponible se acumula.

En la Tabla 11 se relaciona cada atributo con las componentes principales.

Mientras que en la Tabla 12 se indican las coordenadas del consenso de cada muestra dentro del espacio tridimensional que describe el 96 % de la información total.

La información las tablas Tabla 11 y Tabla 12 puede combinarse y representarse en el espacio tridimensional, observado desde varios ángulos en la Figura 14.

Tabla 9 – Descriptores del perfil Flash

Descriptor normalizado	Texto libre original	Cantidad de consumidores que lo emplearon	¿Resultado de interés?
Aroma a frutos secos	Aroma a almendras, olor a frutos secos, olor a maní	3	-
Dulzor	Dulce, dulzor, amargo(-), amargor(-), muy dulce	12	+
Espeso (yo diría que es más adecuado textura)	Espeso, viscoso, textura líquida(-), textura aguada(-), textura acuosa(-), diluido, aguado(-)	14	+
Granuloso	Granuloso, granuloso, arenoso, áspero, suave(-), rasposo	21	+
Aceptabilidad	Aceptabilidad, aceptabilidad general, aceptable, agradable en general	11	+
Sabor a frutos secos	Gusto a nuez, sabor a almendra, sabor a frutos secos, intensidad del sabor a almendra	4	-
Opacidad	Turbidez, blancura, opacidad, intensidad del color, blanco/opaco	5	-
Intensidad del sabor	Intensidad del sabor, sabor a agua (-), sabor aguado (-)	8	-
Sabor a papel	Sabor a papel, gusto a papel, gusto a cartón, cartón	7	+
Intensidad del aroma	Aroma, intensidad del aroma	3	-
Particulado	Con sólidos, sólidos en suspensión, sólidos sedimentables, concentración de partículas	4	+

Tabla 10. Valores propios y acumulados

	F1	F2	F3	F4
Valor propio	1,456	0,762	0,423	0,108
Variabilidad (%)	52,954	27,726	15,379	3,940
% acumulado	52,954	80,681	96,060	100,000

Tabla 11. Atributos y componentes principales

	F1	F2	F3
Aceptabilidad	0,403	0,817	-0,342
Dulzor	0,508	0,158	-0,754
Espesor	0,643	-0,580	-0,282
Granulosidad	-0,946	0,240	0,050
Papel	0,465	0,039	0,578
Particulado	-0,706	0,681	0,065

Tabla 12. Coordenadas de las muestras

	F1	F2	F3
D	0,009	0,690	1,189
TH	0,334	-0,362	-0,361
A	-0,510	-1,543	0,193
MH	-1,773	0,816	-0,589
E	1,940	0,399	-0,431

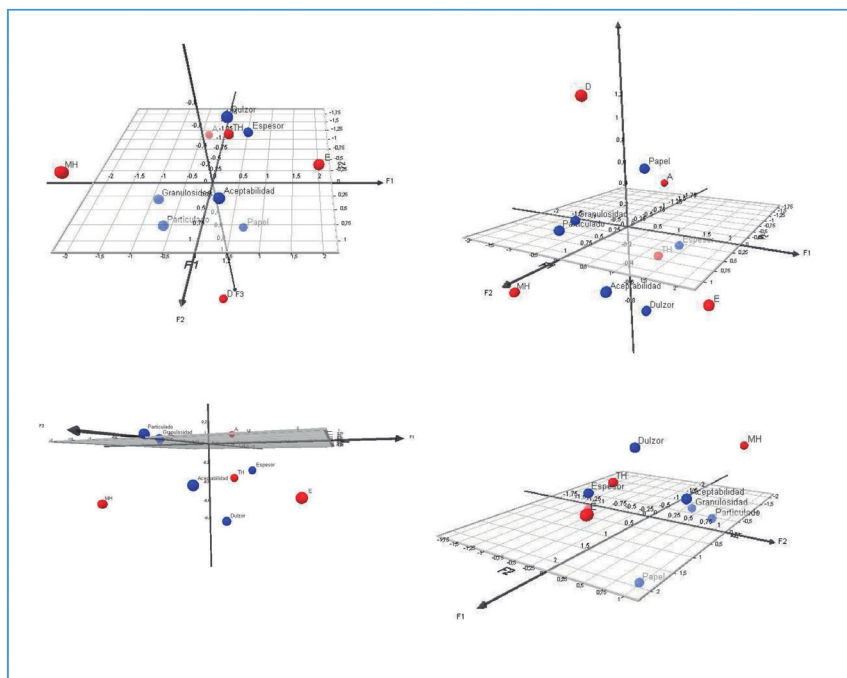


Fig. 14. Espacio tridimensional de las componentes F1, F2 y F3

Para facilitar la visualización, interpretación y comparación de las muestras, es preferible trabajar con los planos principales (Figura 15, Figura 16 y Figura 17):

En cuanto a los atributos, para conocer el nivel de representación que poseen en cada plano, debe observarse la longitud del segmento rojo. Por lo tanto, el dulzor y el "sabor a papel" no pueden juzgarse con la información del plano principal. Asimismo, segmentos con ángulos pequeños, como "granulosidad" y "particulado" demuestran una fuerte

correlación entre ambas variables (Ríos Herrera, 2018). De la misma forma, "aceptabilidad" y "dulzor" en el plano terciario. Ambos atributos presentan segmentos largos y conforman un ángulo pequeño, es decir que son variables relacionadas también. Un ángulo amplio como el conformado por "particulado" y "espesor" es evidencia de una correlación negativa entre ambos atributos. En cuanto al rechazo por *chalkiness*, este efecto no parece ser muy fuerte, puesto a que el ángulo entre "aceptabilidad" y "granuloso/arenoso" y "particulado" no es tan amplio.

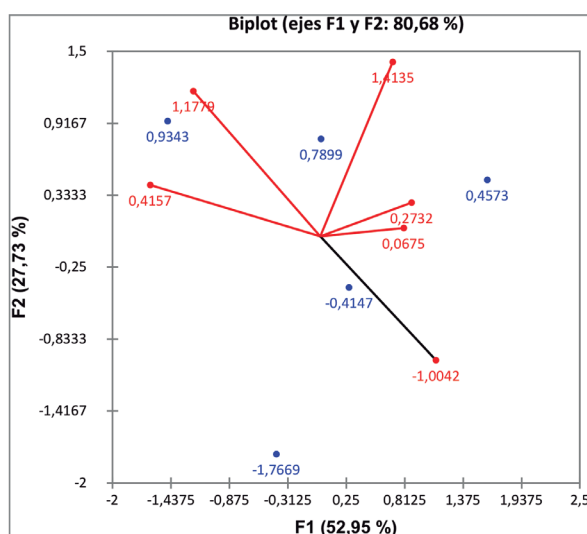


Fig. 15. Plano principal

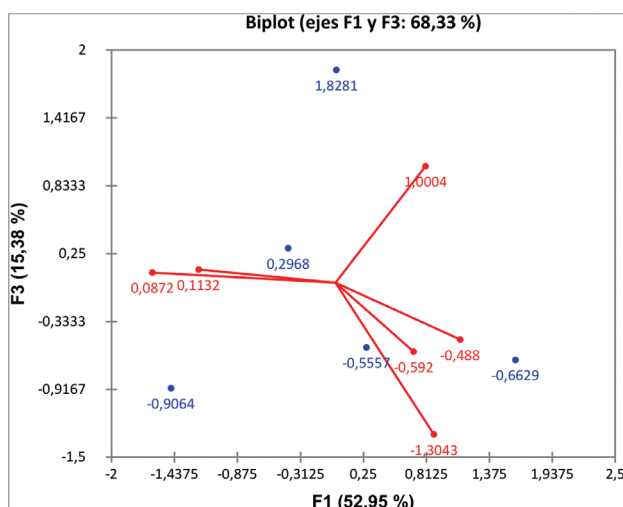


Fig. 16. Plano secundario

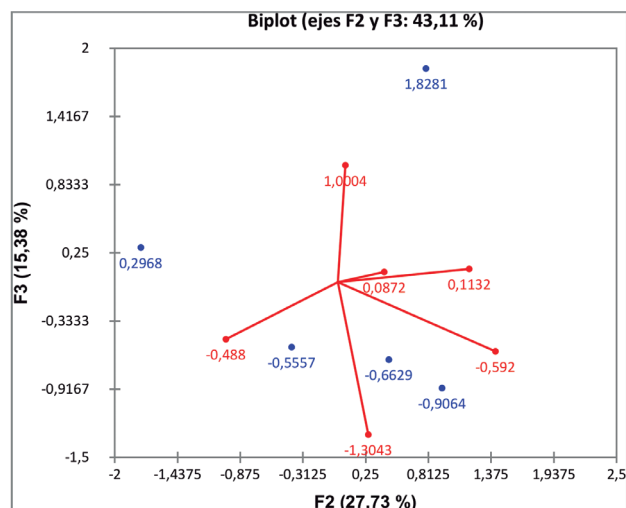


Fig. 17. Plano terciario

En cuanto a las muestras, la A resulta la más diferente al resto, por ubicarse lejos en el plano de F1 y F2 que describe más del 80% de la variabilidad (Figura 15). Es la muestra de bebida de almendras sin agregados de sacarosa y sin tratamiento enzimático.

Las muestras A, MH, TH y E se encuentran bien representadas en el plano principal mientras que la muestra D tiene un fuerte componente de dimensión F3, que allí no se plasma. Por lo tanto, cualquier comparativa para D debe complementarse con otro plano.

Observando entonces las ubicaciones de las coordenadas consenso en relación a los atributos, puede decirse que las muestras TH y E presentan mayor aceptabilidad que el resto y en menor medida D, puesto que se aleja en el eje F3. Es decir que el tratamiento enzimático, mejora la aceptabilidad general. La muestra A, sin azúcar, ni tratamiento, resulta la más rechazada por amplia diferencia. Puede afirmarse entonces que entre las muestras D y E, mientras mayor es la dosis de enzima, mejor aceptabilidad, aunque tiene menor relevancia que el agregado de sacarosa (TH).

El orden de dulzor (TH, E, D, A y MH) es bastante similar al de aceptabilidad y parece ser el factor más determinante para la aceptabilidad.

La granulosis está fuertemente ligada con

la dimensión F1, hacia el semieje negativo, de lo que se desprende que el orden de granulosis/arenosidad es: MH, A, D, TH y E. Es decir, que el tratamiento logró disminuir la arenosidad y aspereza de la muestra respecto a la bebida sin tratamiento (A), pero que grandes cantidades de sacarosa pueden enmascarar y ocultar este atributo.

En conclusión, el tratamiento enzimático E disminuyó la granulosis y aumentó el dulzor, ocupando esta muestra la segunda posición para los consumidores encuestados a la hora de determinar la aceptabilidad. El tratamiento enzimático D no disminuyó la granulosis a niveles perceptibles y aumentó ligeramente el dulzor, contribuyendo a una leve mejora de la aceptabilidad. Es decir, que el agregado de 4 g/L de enzima fue la dosis que logró una mejora mayor en la bebida de almendras (muestra E) y por lo tanto una mejor aceptabilidad por parte de los consumidores.

Efectos de la hidrólisis en la sedimentación de partículas

Las muestras A sin tratar y las inactivadas tras 6 horas de hidrólisis D y E se colocaron en una centrífuga. Se llevó a una velocidad máxima por 15 minutos. El sedimento quedó adherido al fondo de los tubos de ensayos, como se muestra en la Figura 18.

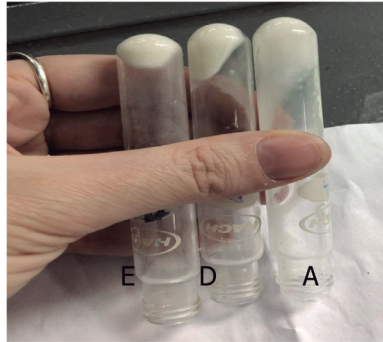


Fig. 18. Muestras tras centrifugación

A simple vista se puede apreciar que las muestras presentan un sedimento creciente de E hacia A. Por consiguiente, a mayor dosis enzimática incrementa la hidrólisis de la celulosa y se reduce el sedimento

Conclusiones

1. Las fibras celulósicas presentes en la bebida de almendras pueden ser hidrolizadas enzimáticamente, mediante el complejo enzimático REC. La velocidad de la hidrólisis tiene una correlación positiva con la temperatura de reacción y con la dosis de enzima.

La disminución de celulosa producida por el tratamiento enzimático de la bebida de almendras se evidencia por la disminución de fibra bruta, aumento de glucosa y por la reducción del sedimento observado en el fondo del recipiente.

2. Dadas las condiciones de hidrólisis propuestas y el hecho de que el proceso tradicional de pasteurización es suficiente para inactivar la enzima, no se requieren etapas ni equipos adicionales en una planta de elaboración para poder realizar la hidrólisis. Solamente se debe prever que el almacenamiento previo a la pasteurización y posterior al agregado de la dosis requerida de enzima sea suficientemente prolongado para permitir el grado de hidrólisis buscado (ejemplo: 6 horas a 13°C si se han dosificado 4 g/L de REC).

3. El consenso indica que la hidrólisis propuesta, realmente mejora la aceptabilidad del producto para una dosis de enzima de 4 g/L (muestra E).

4. El simple agregado de sacarosa logra mejores resultados de aceptabilidad que la hidrólisis enzimática. La sacarosa parece haber enmascarado estos efectos de textura y amargor de la celulosa.

5. La bebida de almendras mostró un comportamiento pseudoplástico y las curvas de flujo fueron modeladas muy satisfactoriamente con el modelo de Herschel-Bulkley. La viscosidad aparente disminuye a medida que aumenta el esfuerzo de corte. Estas características de flujo deben ser tenidas en cuenta al agitar o bombear el producto.

6. El comportamiento reológico de las muestras tratadas enzimáticamente fue similar a la de la muestra no tratada, puesto que el equipo no acepta realizar la medición ante presencia de sólidos y solo se debe colocar la parte fluida de la bebida en el plato del reómetro. Por consiguiente, se puede afirmar que la parte fluida de todas las muestras (A, D y E) presenta una reología similar.

Referencias

- AOAC INTERNATIONAL. (2000). Official Methods of Analysis, 17th edition, Vol. I y II. Maryland, E.E.U.U.
- ARQUERO, O., (2013). Manual del almendro. Sevilla: Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural.
- BELDMAN, G.; VORAGEN, A.G.J.; ROMBOUTS, F.M. & PILNIK, W., (1988) Synergism in cellulose hydrolysis by endoglucanases and exoglucanases purified from *Trichoderma viride*. *Biotechnology and Bioengineering* 31: 173-178.
- BURCHELL NURSERY. (s.f.). Burchell Nursery. Recuperado el 18 de Agosto de 2018, de <http://www.burchellnursery.com/almonds.php>.
- CANTARELLI, C. & LANZARINI, G., (1989). *Biotechnology Applications in Beverage Production*. Dordrecht: Springer Netherlands.
- DEL MÉDICO, A. P. & VITELLESCHI, M. S., (2015). Análisis procrustes generalizado. Una aplicación en el Área agrícola. *Actas Jornadas Anuales - Vigésimas: 18 al 20-11-2015*. Rosario: Facultad de Ciencias Económicas y Estadísticas, UNR.
- EWING, P. & SOARES, D., (s.f.). Parreira Almond Processing Company LLC. Recuperado el 18 de Agosto de 2018, de <https://www.rpacalmonds.com/orchardnews/shasta/>.
- IANNAMICO, L. A., (2012). Almendro: potencialidad de un cultivo moderno. *Revista Fruticultura & Diversificación*, 42-46.
- INTERNATIONAL NUT and DRIED FRUIT COUNCIL, (2019). *Statistical yearbook 2018/2019*. Reus: International Nut and Dried Fruit Council.
- KOKINI, J. L., (1987). The Physical Basis of Liquid Food Texture and Texture-Taste Interactions. *Journal of Food Engineering*, 51-81.
- LEE, CH.; KIM, D. H.; KIM, J.H.; BAE, S. E.; SEO, J. H. y OH, T. K., (2005) Enhancement of natural pigment extraction using *Bacillus* species xylanase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 2541-2545.
- MARQUINA, D., (2005). Producción de biomasa de hongos celulolíticos para la degradación de residuos celulósicos. Universidad Complutense de Madrid. 47 p.
- MARTÍNEZ-GÓMEZ, P.; SÁNCHEZ-PÉREZ, R.; DICENTA, F.; HOWAD, W.; ARÚS, P. & GRADZIEL, T., (2007). *Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants*, Volume 4. Berlín, Springer.
- MONTORO, J. (s.f.). Almendros. Recuperado el 15 de febrero de 2020, de Un huerto en el fuerte del rey: <http://huerto-fuertedelrey.blogspot.com/p/los-almendros.html>.
- OVANDO CHACÓN, S. L. & WALISZEWSKI, K. N., (2005) Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. *Universidad y Ciencia*, 21. (42). 113-122
- RASTOGI, N. K.; RAJESH, G. y SHAMALA, T. R., (1998) Optimization of enzymatic degradation of coconut residue. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 76: 129-134.
- RÍOS HERRERA, L. F., (2018 de junio de 2018). Análisis de Componentes Principales (ACP). Recuperado el 15 de febrero de 2020, de Corporación Universitaria Empresarial: <https://www.youtube.com/watch?v=jXteNh1Ks1w>
- RODRÍGUEZ-MAYOR, L.; AGUADO, J. y ROMERO, M., (2005). Hidrólisis de celobiosa con Beta-glucosidasa inmovilizada. Universidad Complutense de Madrid. 276 p.
- SARKER, B. C.; SINGH, R. K.; KUMBHAR, B. K.; AGRAWAL, Y. C. y KULSHRESHTHA, M. K., (1999) Response surface analysis of enzyme assisted oil extraction factors for sesame, groundnut and sunflower seeds. *Journal of Food Science and Technology* 36: 511-514.
- SILVA PAZ, R.; HUAMÁN LLAJA, M.; HURTADO DE MENDOZA MERINO, K.; BRAVO ARANÍBAR, N. & SILVA BAIGORRIA, A. (2016). Caracterización sensorial de salsa a base de hongos (*Pleurotus ostreatus*) mediante la técnica Perfil Flash. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 1-16.

NO SÉ BIEN A QUÉ CORRESPONDE ESTA CITA

http://www.fundacionfedna.org/tecnicas_de_analisis/fibra-bruta-celulosa-bruta