



UNIVERSITAT POLITÈCNICA
DE CATALUNYA
BARCELONATECH

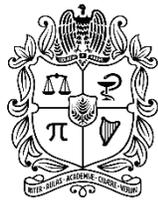
Aplicación de la fermentación láctica como estrategia de transformación y valorización de matrices vegetales

María Angélica Benavides Martín

ADVERTIMENT La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del repositori institucional UPCCommons (<http://upcommons.upc.edu/tesis>) i el repositori cooperatiu TDX (<http://www.tdx.cat/>) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual **únicament per a usos privats** emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei UPCCommons o TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a UPCCommons (*framing*). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del repositorio institucional UPCCommons (<http://upcommons.upc.edu/tesis>) y el repositorio cooperativo TDR (<http://www.tdx.cat/?locale-attribute=es>) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual **únicamente para usos privados enmarcados** en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio UPCCommons. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a UPCCommons (*framing*). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the institutional repository UPCCommons (<http://upcommons.upc.edu/tesis>) and the cooperative repository TDX (<http://www.tdx.cat/?locale-attribute=en>) has been authorized by the titular of the intellectual property rights **only for private uses** placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading nor availability from a site foreign to the UPCCommons service. Introducing its content in a window or frame foreign to the UPCCommons service is not authorized (*framing*). These rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA



UNIVERSITAT POLITÈCNICA
DE CATALUNYA
BARCELONATECH

Aplicación de la fermentación láctica como estrategia de transformación y valorización de matrices vegetales

María Angélica Benavides Martín

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química y Ambiental
Bogotá D.C., Colombia

Universitat Politècnica de Catalunya
Departament de Enginyeria Química
Barcelona, España

2019

Aplicación de la fermentación láctica como estrategia de transformación y valorización de matrices vegetales

María Angélica Benavides Martín

Tesis presentada para optar al título de:
Doctor en Ingeniería - Ingeniería Química
Doctor en Ingeniería de Procesos Químicos

Directores:

Marta Cecilia Quicazán Sierra

María Pilar Almajano Pablos

Paulo César Narváez Rincón

Línea de Investigación: Bioprocesos

Grupos de Investigación:

Procesos Químicos y Bioquímicos

A Dios por las bendiciones y esos pequeños regalos de cada día.

A mis padres porque son una fuente infinita de paciencia, cuidados y amor.

A Esteban y María Camila que hacen que tenga ganas de levantarme cada día.

A Jose, que nunca me ha dejado desfallecer, me ha hecho sentir verdaderamente feliz a pesar de las dificultades. No encuentro las palabras para expresar lo mucho que significas en mi vida.

Solo ustedes saben lo dura que ha sido esta etapa de mi vida.

Agradecimientos

Al Departamento Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Colciencias y a la Dirección de Investigación de la Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá (DIB) por financiar mis estudios y el proyecto “*Generación de valor en matrices vegetales mediante la aplicación de la fermentación láctica*”.

Al Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA) de la Universidad Nacional de Colombia y a todo el personal tanto administrativo como docente que me permitió desarrollar todas las actividades experimentales.

Al Departamento de Ingeniería Química y Ambiental de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de Colombia, por el soporte para las actividades académicas requeridas para la obtención de este título. En especial al profesor Néstor Algecira por su apoyo incondicional para la gestión del proyecto.

A la profesora Marta Quicazán por sus ideas, visión y enseñanzas, que he aplicado en todos los aspectos de mi vida, no solo en el profesional. Al profesor Paulo César Narváez por orientar, impulsar, organizar y darle un enfoque y un sentido especial a mi trabajo. Por su paciencia y comprensión. Sin su apoyo este trabajo simplemente no habría culminado.

A la Universidad Politécnica de Cataluña por el soporte brindado que me ha permitido terminar este proyecto y realizar la doble titulación. A la profesora María Pilar Almajano por recibirme en su grupo de investigación, mostrarme una forma diferente de trabajo y hacerme replantear cada una de las decisiones que he tomado. Ese intercambio de puntos de vista me ha hecho crecer y valorar otros aspectos de mi vida. Esta experiencia nunca hubiera sido la misma sin ella.

A todos mis amigos, espero no olvidar a ninguno: William no te imaginas lo importante que fue tu ayuda (¿o a lo mejor sí?), Amaury, Brian, Andrés, Claudia (Salazar y Hernández), Ana Ruby, Carlos (Fuenmayor y Zuluaga), Marta, Dorita, Álvaro, Gregorio, Carolina, Héctor, Edwin, Brian, Aura y todos los fieles de la hora del té, Juliana, Manel, Love, Moha y Carla. Todos me acogieron y me hicieron sentir acompañada a lo largo de este camino.

Resumen

Con el fin de aprovechar el potencial agrícola, en Colombia vienen impulsándose estrategias para incrementar la producción hortofrutícola y reducir las pérdidas de alimentos ocasionadas por el bajo consumo y la poca transformación. El objetivo general de esta tesis fue el establecimiento de las condiciones de proceso que permitan la generación de valor en frutas y hortalizas, mediante la aplicación de la fermentación láctica.

Para ello, se seleccionaron frutas, hortalizas y mezclas de éstas, considerando criterios como producción, comercialización, aceptabilidad y viabilidad de bacterias lácticas. Posteriormente, se evaluó la influencia de la neutralización y del acondicionamiento de cultivo, sobre el crecimiento de las bacterias lácticas, encontrándose que su efecto no es significativo. El estudio de la fermentación láctica de mezclas permitió obtener productos con una buena aceptabilidad y alta concentración de probióticos (1×10^8 UFC/g). Finalmente, el estudio de vida útil confirmó que la mezcla amarilla (mango 80% p/p y ahuyama 20% p/p) fermentada y almacenada a la misma temperatura (5°C), conserva su calidad por más tiempo (46 días) frente a la mezcla sin fermentar (12 días).

Se concluyó que, el proceso diseñado permite la conservación del producto, sin alterar la capacidad antirradicalaria propia de la fruta y hortalizas frescas, le agrega propiedades funcionales y puede implementarse fácilmente por los campesinos productores en el ámbito del agro colombiano.

Palabras clave: bacterias lácticas, frutas y hortalizas, fermentación láctica, vida útil.

Abstract

In order to take advantage of the agricultural potential in Colombia, strategies are being promoted to increase the production of fruits and vegetables. Simultaneously, there are large quantities of losses of these foods, caused by low consumption and a stagnation in the transformation sector. To reduce these losses and respond to these needs, lactic fermentation on fruits and vegetables was evaluated. The aim of this research was focus on the establishment of process conditions for lactic fermentation to generate of value in fruits and vegetables. In this way, fruits and vegetables were selected and mixed to stimulate the acceptability and viability of lactic bacteria and a new selection of these mixtures was made. Afterward, it was evaluated whether the use of preliminary processes (neutralization and conditioning) improve the growth of lactic bacteria or not. Applying these results, lactic fermentation of mixtures was studied using physicochemical, microbiological and sensory variables. Finally, shelf-life of the product obtained was carried out: mixture between a fruit and a vegetable, with a high probiotics concentration (1×10^8 CFU / g). The designed process allows the product preservation, without altering the anti-radical capacity of fresh fruit or vegetable, adds functional properties and can be easily implemented by farmer in the field of Colombian agriculture.

Keywords: Lactic bacteria, fruits and vegetables, lactic fermentation, shelf-life.

Contenido

	Pág.
	I
Resumen	IX
Lista de figuras	XIV
Lista de tablas	XVII
Lista de Símbolos y abreviaturas	XIX
Prefacio	1
1. Introducción	5
1.1 Fermentación láctica	5
1.1.1 Bacterias ácido lácticas	7
1.1.2 Fermentación de vegetales	9
1.1.3 Los antioxidantes.....	13
1.1.4 Modelos de cinéticas de fermentación.....	21
1.2 Estudio de vida útil	28
1.2.1 Estimación de vida útil por deterioro sensorial	33
1.2.2 Estimación de vida útil por deterioro microbiológico	35
2. Planteamiento del problema	40
2.1 Objetivo general	41
2.2 Objetivos específicos.....	41
2.3 Estrategia general	42
3. Materiales y métodos	46
3.1 Materiales	46
3.1.1 Obtención de pulpas de frutas y hortalizas.....	46
3.1.2 Estudio de la fermentación láctica	47
3.1.3 Estudio de vida útil	47
3.2 Métodos	48
3.2.1 Caracterización fisicoquímica y microbiológica de pulpas y mezclas ...	48
3.2.2 Caracterización de carbohidratos y ácidos orgánicos	50
3.2.3 Caracterización sensorial.....	51
3.2.4 Determinación de la capacidad antirradicalaria	52
3.3 Procedimientos experimentales.....	54
3.3.1 Obtención de pulpas de frutas y hortalizas.....	54
3.3.2 Preparación de mezclas.....	56

3.3.3	Operaciones previas a la fermentación	56
3.3.4	Fermentación de pulpas.....	58
3.3.5	Estudio de vida útil	58
3.4	Análisis estadístico	59
3.4.1	Caracterizaciones de las pulpas y estudio de la fermentación	59
3.4.2	Caracterización sensorial	59
3.4.3	Selección de mezclas.....	59
4.	Selección de frutas y hortalizas	61
4.1	Pérdidas y desperdicios de frutas y hortalizas	61
4.2	Producción, comercialización y mercado de frutas y hortalizas en Colombia	63
4.2.1	Acuerdos de comercio exterior	68
4.2.2	Organización por cadenas productivas.....	69
4.3	Panorama técnico y comercial de las frutas y hortalizas seleccionadas	73
4.4	Consumo de frutas y hortalizas.....	81
5.	Selección de mezclas	85
5.1	Caracterización de pulpas amarillas	86
5.1.1	Caracterización de las pulpas amarillas sin mezclar	86
5.1.2	Caracterización del color de las mezclas amarillas	87
5.1.3	Caracterización de pH y acidez titulable de mezclas amarillas.....	93
5.1.4	Caracterización de sólidos solubles y totales de mezclas amarillas.....	94
5.1.5	Análisis estadístico de resultados de caracterización para la selección de mezclas amarillas.....	95
5.2	Caracterización de pulpas rojas.....	98
5.2.1	Caracterización de las pulpas rojas sin mezclar.....	99
5.2.2	Caracterización del color en las mezclas rojas.....	100
5.2.3	Caracterización de pH y acidez titulable de las mezclas rojas.....	100
5.2.4	Caracterización de sólidos solubles y totales de mezclas rojas.....	101
5.2.5	Análisis estadístico de los resultados de caracterización y selección de pulpas rojas	102
5.3	Caracterización de pulpas verdes.....	105
5.3.1	Caracterización de las pulpas verdes sin mezclar	105
5.3.2	Caracterización del color de las mezclas verdes.....	106
5.3.3	Caracterización de pH y acidez titulable de mezclas verdes	108
5.3.4	Caracterización de sólidos solubles y totales de mezclas verdes	109
5.3.5	Análisis estadístico de resultados de caracterización para la selección de mezclas verdes	109
5.4	Análisis sensorial de las mezclas.....	112
6.	Evaluación de la fermentación	116
6.1	Estudio de operaciones previas	116
6.1.1	Diseño experimental para evaluar la neutralización	116
6.1.2	Resultados de la neutralización	117
6.1.3	Diseño experimental el acondicionamiento de los cultivos	120
6.1.4	Resultados del acondicionamiento de los cultivos	121
6.2	Fermentación de mezclas	126
6.2.1	Diseño experimental.....	126
6.2.2	Resultados de variables fisicoquímicas y crecimiento bacteriano	128
6.2.3	Resultados de la evaluación sensorial.....	132

6.2.4	Resultados de otros autores para la fermentación láctica de sustratos similares	140
7.	Estudio cinético de fermentación	144
7.1	Cinéticas crecimiento	145
7.2	Evaluación de actividad antirradicalaria	151
7.3	Seguimiento de carbohidratos y ácidos orgánicos	159
8.	Evaluación de la vida útil	164
8.1	Mezcla amarilla sin fermentar	165
8.2	Mezcla amarilla fermentada	166
8.2.1	Resultados del seguimiento de variables	166
8.2.2	Modelamiento	172
9.	Conclusiones y recomendaciones	179
9.1	Conclusiones	179
9.2	Recomendaciones	182
	Bibliografía	183
	ANEXO A. Análisis estadístico de ordenamiento. Conveniencia vs Utilidad	203
	ANEXO B. Rectas de calibración de los métodos analíticos empleados	205
	ANEXO C. Resultados de caracterización de mezclas	207
	ANEXO D. Resultados de la evaluación de operaciones preliminares	229
	ANEXO E. Resultados de fermentación de hortalizas empleando otros cultivos	247
	ANEXO F. Análisis sensorial	248
	ANEXO G. Resultados exploratorios con nariz electrónica	250
	ANEXO H. Escala de color normas NTC	254

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1.1: Esquema de la disociación del ácido cítrico.....	13
Figura 1.2: Especiación del ácido cítrico frente al pH en soluciones acuosas.....	13
Figura 1.3: Crecimiento microbiano en un proceso fermentativo discontinuo.	23
Figura 1.4: Establecimiento del tiempo de vida útil mediante de punto de corte.....	35
Figura 3.1: Proceso para la obtención de pulpa de frutas y hortalizas.	54
Figura 3.2: Esquema del acondicionamiento del cultivo.....	57
Figura 3.3: Esquema para la adición directa del cultivo (sin acondicionamiento).....	57
Figura 3.4: Proceso para la fermentación de pulpas de frutas, hortalizas y mezclas.	58
Figura 4.1: Reporte de pérdidas y desperdicios en los diferentes niveles de la cadena de suministro de alimentos.....	62
Figura 4.2: Cifras de comercio exterior de frutas y hortalizas.	64
Figura 4.3: Cifras de comercio exterior para Colombia.	65
Figura 4.4: Indicadores de productivos para el sector agrícola.....	66
Figura 4.5: Producto interno bruto y valor agregado.	67
Figura 4.6: Indicadores de producción y comercialización de productos hortofrutícolas rojos.....	78
Figura 4.7: Indicadores de producción y comercialización para productos hortofrutícolas amarillos.....	79
Figura 4.8: Indicadores de producción y comercialización de productos hortofrutícolas verdes.....	80
Figura 5.1: Color de mezclas de uchuva con (A) zanahoria y (B) ahuyama.	87
Figura 5.2: (A) Diferencias de color en mezclas de uchuva (con ahuyama o zanahoria) y pulpas sin mezclar como referencia (*). (B) Color en mezclas de uchuva.....	88
Figura 5.3: Color en mezclas de maracuyá con (A) zanahoria y (B) y ahuyama.....	89
Figura 5.4: (A) Diferencias de color en mezclas de maracuyá tomando como referencia las pulpas sin mezclar. (B) Propiedades del color en las mezclas de maracuyá.....	90
Figura 5.5: Color en mezcla de mango con (A) zanahoria y (B) y ahuyama.	91
Figura 5.6: (A) Diferencias de color en mezclas de mango tomando como referencia las pulpas sin mezclar. (B) Propiedades del color en las mezclas de mango.	92
Figura 5.7: (A) pH y (B) acidez titulable de mezclas amarillas.	93
Figura 5.8: (A) Sólidos solubles y (B) y sólidos totales de mezclas amarillas.	95
Figura 5.9: Análisis por componentes principales de la caracterización de mezclas amarillas.....	96

Figura 5.10: Análisis de utilidad y conveniencia en la caracterización de mezclas amarillas.....	97
Figura 5.11: (A) pH y (B) acidez titulable de mezclas de pulpas rojas.....	101
Figura 5.12: Análisis por componentes principales de la caracterización de mezclas rojas.....	102
Figura 5.13: Análisis de utilidad y conveniencia a partir de la caracterización de mezclas rojas.....	103
Figura 5.14: Esquema de cambios en la clorofila que modifican el color del alimento...	107
Figura 5.15: (A) pH y (B) acidez titulable de mezclas verdes.....	108
Figura 5.16: Análisis por componentes principales a partir de la caracterización de mezclas verdes.....	110
Figura 5.17: Análisis de utilidad y conveniencia de la caracterización de mezclas verdes.....	111
Figura 5.18: Resultados de análisis hedónico de las pulpas de hortalizas y mezclas....	112
Figura 5.19: Análisis descriptivo (QDA) para ahuyama, mango y mezcla amarilla.	114
Figura 6.1: Esquema para la evaluación del acondicionamiento en diferentes sustratos.....	121
Figura 6.2: Crecimiento bacteriano durante la fermentación de mango con y sin acondicionamiento del cultivo.....	122
Figura 6.3: Esquema para la evaluación de la fermentación con diferentes cultivos.	127
Figura 6.4: Sólidos solubles y bacterias lácticas durante la fermentación de mezclas con el cultivo mixto 1.	128
Figura 6.5: pH y acidez titulable durante la fermentación de mezclas con el cultivo mixto1.....	128
Figura 6.6: (A) pH, (B) acidez titulable, (C) sólidos solubles y (D) bacterias lácticas antes y después de la fermentación de pulpas de frutas, hortalizas y sus mezclas.....	130
Figura 6.7: Análisis sensorial de mezclas sin fermentar y fermentadas con varios cultivos.....	134
Figura 6.8: Análisis descriptivo (QDA) para las pulpas de ahuyama (A) y mango (B) antes y después de la fermentación.....	137
Figura 6.9: Análisis descriptivo (QDA) para la mezcla amarilla, antes y después de fermentar.....	138
Figura 6.10: Análisis descriptivo (QDA) para ahuyama, mango y mezcla, (A) antes y (B) después de la fermentación.	138
Figura 6.11: Análisis descriptivo (QDA) obtenido por el panel de expertos para la mezcla amarilla antes y después de la fermentación.....	139
Figura 7.1: Crecimiento de las bacterias lácticas inoculadas en diferentes sustratos durante la fermentación.....	146
Figura 7.2: Ajuste de modelos cinéticos para el crecimiento bacteriano en (A) la mezcla amarilla y (B) en la pulpa de ahuyama.....	147
Figura 7.3: Contenido de polifenoles totales en las pulpas rojas (A) y amarillas (B) durante el proceso fermentativo.....	152
Figura 7.4: Capacidad antirradicalaria de las pulpas rojas durante la fermentación.	153
Figura 7.5: Capacidad antioxidante de las pulpas amarillas durante la fermentación....	154

Figura 8.1: Seguimiento del crecimiento de mohos y levaduras como factor de deterioro microbiológico en la mezcla amarilla sin fermentar.	166
Figura 8.2: Seguimiento de bacterias lácticas viables durante el almacenamiento de la mezcla amarilla fermentada a diferentes temperaturas.....	167
Figura 8.3: Seguimiento de (A) sólidos solubles (B) pH como factores de deterioro fisicoquímico durante el almacenamiento de la mezcla amarilla fermentada a diferentes temperaturas.	167
Figura 8.4: Seguimiento de mohos y levaduras como factor de deterioro microbiológico en la mezcla amarilla fermentada y almacenada a diferentes temperaturas.....	168
Figura 8.5: Análisis hedónico de la mezcla amarilla fermentada y almacenada a temperatura ambiente.....	170
Figura 8.6: Capacidad antioxidante de las pulpas amarillas durante el almacenamiento en diferentes temperaturas. (A) Polifenoles totales, (B) ABTS y (C), FRAP.....	171
Figura 8.7: Ajuste de la acidez titulable como factor de deterioro fisicoquímico en la mezcla amarilla fermentada y almacenada en diferentes temperaturas.....	172
Figura 8.8: Ajuste lineal del modelo de Arrhenius en la cinética de deterioro fisicoquímico en la mezcla amarilla fermentada y almacenada a diferentes temperaturas.....	173
Figura 8.9: Ajuste de mohos y levaduras como factor de deterioro microbiológico en la mezcla amarilla fermentada y almacenada a diferentes temperaturas.....	174
Figura 8.10: Ajuste del modelo de Arrhenius en la cinética de deterioro microbiológico en la mezcla amarilla fermentada y almacenada a diferentes temperaturas.....	175
Figura 8.11: Gráfica de tiempo de vida útil de la mezcla amarilla fermentada.	176

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1-1 Ejemplos de fermentación láctica aplicados en alimentos de origen vegetal. ...	10
Tabla 1-2. Constantes de disociación de ácidos orgánicos.....	12
Tabla 1-3. Principales aspectos de las técnicas analíticas más empleadas en la determinación de la actividad antirradicalaria.	16
Tabla 1-4. Modelos matemáticos empleados para describir el crecimiento microbiano... ..	24
Tabla 1-5. Modelo de Gompertz aplicado en la fermentación láctica de alimentos.....	28
Tabla 1-6. Ecuaciones de cinética de acuerdo con el orden de la reacción de deterioro.	31
Tabla 1-7. Criterios de calidad microbiológica (UFC/g) en productos hortofrutícolas procesados.....	36
Tabla 3-1. Características de calidad de las frutas seleccionadas de acuerdo con la normatividad colombiana vigente.	46
Tabla 3-2 Técnicas analíticas para la caracterización microbiológica de pulpas.....	48
Tabla 3-3 Técnicas analíticas a emplear para la caracterización fisicoquímica de pulpas de frutas y hortalizas.....	48
Tabla 3-4 Condiciones empleadas para la determinación de carbohidratos y ácidos orgánicos por HPLC.....	50
Tabla 3-5. Condiciones empleadas para la determinación de carbohidratos y ácidos orgánicos por HPLC.....	51
Tabla 3-6 Requisitos fisicoquímicos para las pulpas de frutas seleccionadas.	55
Tabla 3-7 Requisitos microbiológicos de pulpas de frutas.	55
Tabla 3-8 Esquema de ensayos experimentales para la obtención de mezclas de frutas y hortalizas.....	56
Tabla 3-9 Ponderación de variables y función de transformación para el análisis estadístico de ordenamiento	60
Tabla 4-1. Frutas y hortalizas priorizadas en los principales TLC con Colombia.	68
Tabla 4-2 Exportaciones de fruta y hortalizas en fresco 2000-2015.	69
Tabla 4-3 Indicadores productivos en cultivos de frutas en Colombia.	71
Tabla 4-4 Indicadores productivos en cultivos de hortalizas en Colombia.....	71
Tabla 4-5. Información de botánica de las frutas y las hortalizas seleccionadas.	74
Tabla 5-1. Caracterización de pulpas amarillas sin mezclar.	87
Tabla 5-2. Caracterización de pulpas de remolacha, guayaba, fresa y mora sin mezclar.	99
Tabla 5-3. Caracterización de pulpas de espinaca, guatila, lulo y feijoa sin mezclar.	105

Tabla 5-4. Evaluación sensorial por panelistas de pulpas de ahuyama, mango y mezcla amarilla.....	113
Tabla 5-5. Caracterización fisicoquímica de las mezclas amarilla, roja y verde.....	115
Tabla 6-1. Atributos y diferencias de color en las pulpas de frutas rojas debidas a la neutralización.....	118
Tabla 6-2. Atributos y diferencias de color en las pulpas de frutas amarillas debidas a la neutralización.....	118
Tabla 6-3. Atributos y diferencias de color en las pulpas de frutas verdes debidas a la neutralización.....	119
Tabla 6-4. Valoración de pH y bacterias lácticas en pulpas de fresa, uchuva y lulo neutralizadas e incubadas.....	119
Tabla 6-5 Esquema de ensayos para la evaluación del acondicionamiento del cultivo.	121
Tabla 6-6. Propiedades fisicoquímicas antes y después de la fermentación de mango, con y sin acondicionamiento del cultivo.....	122
Tabla 6-7. Propiedades fisicoquímicas antes y después de la fermentación de ahuyama, con y sin acondicionamiento del cultivo.....	124
Tabla 6-8. Detalle de la cantidad de bacterias en las pulpas de hortalizas fermentadas con y sin acondicionamiento previo del cultivo.....	125
Tabla 6-9. Propiedades fisicoquímicas y cantidad de bacterias lácticas antes y después de la fermentación de mezclas con el cultivo mixto 1.....	129
Tabla 6-10. Propiedades fisicoquímicas y bacterias lácticas antes y después de la fermentación de mezclas con diferentes cultivos.....	131
Tabla 6-11. Resultados de análisis sensorial hedónico.....	133
Tabla 6-12. Resultados de la evaluación sensorial de pulpas de ahuyama, mango y mezcla amarilla, antes y después de la fermentación.....	136
Tabla 6-13. Reportes de estudios de fermentación láctica en frutas y hortalizas.....	140
Tabla 7-1. Modelos matemáticos considerados para la cinética del crecimiento microbiano.....	144
Tabla 7-2. Ajuste experimental de modelos cinéticos para la fermentación de mezcla amarilla y pulpa de ahuyama.....	148
Tabla 7-3. Contenido de polifenoles consumidos diariamente en diferentes alimentos.	155
Tabla 7-4. Antioxidantes consumidos diariamente en diferentes alimentos.....	156
Tabla 7-5. Coeficiente de correlación entre las técnicas analíticas empleadas para la determinación de la capacidad antirradicalaria de las pulpas.....	157
Tabla 7-6. Polifenoles totales y capacidad antirradicalaria antes y después de la fermentación de pulpas de hortalizas y mezclas.....	158
Tabla 8-1. Plan de muestreo para el estudio de vida útil de acuerdo con las temperaturas de almacenamiento.....	164
Tabla 8-2. Seguimiento de propiedades fisicoquímicas y microbiológicas de mezcla amarilla sin fermentar.....	165
Tabla 8-3. Aplicación del modelo de Arrhenius en la cinética de deterioro a partir de la acidez titulable.....	173
Tabla 8-4. Aplicación del modelo de Arrhenius en la cinética de deterioro microbiano..	174

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
C^*	<i>Chroma</i> - saturación	1	Ecuación 3.2
h	<i>hue</i> - tonalidad	1	Ecuación 3.3
AUC	Área bajo la curva de la muestra	1	Ecuación 3.6
$AUCB$	Área bajo la curva del blanco	1	Ecuación 3.6
f	Unidades de fluorescencia	1	Tabla 3-1
U	Utilidad	1	Ecuación 3.7
C	Conveniencia	1	Ecuación 3.8

Símbolos con letras griegas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
ΔE	Diferencia absoluta de color	1	Ecuación 3.1
λ	Longitud de onda	nm	

Abreviaturas

Abreviatura	Término
<i>AAPH</i>	2,2,-Azobis(2-Metilpropinamida)
<i>ABTS</i>	2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)
<i>Abs</i>	Absorbancia
<i>Ay</i>	Ahuyama (<i>Cucurbita maxima</i>)
<i>Av</i>	Avena
<i>DPPH</i>	2,2- difenil- 1-picrilhidracil
<i>Es</i>	Espinaca (<i>Spinacia oleracea</i>)
<i>Fj</i>	Feijoa (<i>Acca sellowiana</i>)
<i>FjEs</i>	Mezcla de feijoa y espinaca
<i>Fr</i>	Fresa (<i>Fragaria chiloensis</i>)
<i>FRAP</i>	<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>
<i>GAE</i>	Equivalentes de ácido gálico
<i>Gy</i>	Guayaba (<i>Psidium guajava</i>)
<i>GyRm</i>	Mezcla de guayaba y remolacha
<i>Gt</i>	Guatila (<i>Sechium edule</i>)
<i>LI</i>	Lulo (<i>Solanum quitoense</i>)

Abreviatura Término

<i>meq</i>	miliequivalentes
<i>Mg</i>	Mango (<i>Mangifera indica</i>)
<i>MgAy</i>	Mezcla de mango y ahuyama
<i>Mr</i>	Mora (<i>Rubus glaucus</i>)
<i>My</i>	Maracuyá (<i>Passiflora edulis</i>)
<i>NMP</i>	Número más probable
<i>ORAC</i>	<i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i>
<i>PCA</i>	<i>Principal Components Analysis</i>
<i>QDA</i>	<i>Quantitative Descriptive Analysis</i>
<i>Rm</i>	Remolacha (<i>Beta vulgaris</i>)
<i>S</i>	Bebida de soya
<i>SD</i>	Desviación estándar
<i>t</i>	Tiempo
<i>TE</i>	Equivalentes de Trolox
<i>TEAC</i>	<i>Trolox equivalent antioxidant capacity</i>
<i>TPTZ</i>	2, 4, 6- Tripyridyl-s-Triazina
<i>Trolox</i>	6-hidroxi-2, 5, 7, 8 - tetrametilcromo- 2-Ácido Carboxílico
<i>Uc</i>	Uchuva (<i>Physalis peruviana</i>)
<i>UFC</i>	Unidades formadoras de colonias
<i>Zn</i>	Zanahoria (<i>Daucus carota</i>)

Prefacio

Colombia tiene el potencial para convertirse en una de las despensas de alimentos para el mundo. Este potencial ha sido identificado a partir de la evaluación del estado actual del uso de suelos, las características hidrográficas, geográficas y biológicas y de la comparación con los ecosistemas de otros países. Gracias a este panorama, se han puesto en marcha diferentes estrategias, tanto a nivel de investigación como de agroindustria, para aumentar la producción de especies vegetales (EFE, 2016; Portafolio, 2017a,b).

El consumo de frutas y de hortalizas varía de acuerdo con diferentes factores: sociales, económicos, el medio geográfico, las creencias y tradiciones culturales y la disponibilidad. Colombia tiene un suministro estable de frutas y hortalizas a lo largo de todo el año. Por ello, la mayor parte de su consumo se realiza en fresco, lo que ha ocasionado un estancamiento en el sector, especialmente en el procesamiento y la transformación (Fao and MinSalud, 2013; DANE, 2016).

De forma paralela, se observan cifras preocupantes relacionadas con las pérdidas de alimentos en el país. En 2016 se perdieron 9,76 millones de toneladas de alimentos, distribuidos así: 62% de frutas y verduras, 25% de raíces y tubérculos, 8% de cereales, mientras que 3,5% corresponde a cárnicos, pescado y lácteos. Las mayores pérdidas de frutas y hortalizas se encuentran en la producción, la poscosecha y el almacenamiento. Por ello, es importante enfocar los esfuerzos en disminuir éstas pérdidas, a través del mejoramiento de las etapas de transformación y procesamiento (DNP, 2016).

Teniendo en cuenta estos aspectos, en esta tesis doctoral se consideró la aplicación de un proceso de transformación de las frutas y hortalizas de manera que pueda ofrecerse una alternativa para el consumo de estos productos, que proporcione un valor agregado y que a su vez favorezca su conservación. La fermentación láctica cumple con estas características.

Este proceso fermentativo ha sido empleado como un método de transformación y conservación de alimentos a lo largo de la historia. Se caracteriza por permitir el alcance de diferentes objetivos de forma simultánea: la conservación del alimento mediante la producción de ácido láctico y de metabolitos secundarios con actividad bactericida, el mejoramiento de la seguridad a través de la inhibición de patógenos, la transformación de las características sensoriales, en especial las relacionadas con el aroma, sabor y textura, y un impacto positivo en la salud de los consumidores al favorecer la digestibilidad de algunos nutrientes por medio del empleo de microorganismos con actividad probiótica (Caplice, 1999; Fao, 2001; Del Piano *et al.*, 2006; Aureli *et al.*, 2011; Foligné *et al.*, 2013; Hugenholtz, 2013; Butel, 2014; Reid, 2016).

Este proyecto fue concebido a partir de múltiples experiencias trabajando como parte del grupo de investigación de “*Aseguramiento de la calidad y desarrollo de nuevos productos*” en proyectos de interacción entre tres sectores productivos: apicultores, academia e investigación y comercializadores. El propósito inicial de este proyecto fue fundamentar una idea de emprendimiento tecnológico junto con productores colombianos de frutas y hortalizas. Por este motivo, se consideró la aplicación de técnicas analíticas básicas, que permitiera la transferencia tecnológica a mediano plazo.

Se resalta entonces que la innovación de este proyecto se encuentra en la aplicación de un proceso de transformación y conservación, como la fermentación láctica, a un sustrato de frutas y hortalizas para obtener un crecimiento bacteriano que pudiera darle un carácter funcional al alimento.

El presente documento presenta los resultados obtenidos en esta investigación en ocho capítulos, descritos brevemente a continuación:

- El primero muestra los fundamentos de la fermentación láctica y del estudio de vida útil, necesarios para alcanzar los objetivos propuestos.
- En el segundo se desarrolla el planteamiento del problema, las preguntas de investigación, la hipótesis, los objetivos planteados y la estrategia general.
- El tercer capítulo recopila los materiales y métodos aplicados a lo largo de todo el proyecto.

A partir de aquí, se recogen los resultados, del capítulo cuarto al octavo:

- El cuarto capítulo describe los aspectos estudiados para la selección inicial de las frutas y hortalizas con las cuales se continuó el estudio.
- El quinto capítulo presenta el proceso de selección de las mezclas con las que se realizaron los ensayos experimentales de fermentación.
- El sexto capítulo muestra los resultados de la evaluación de la fermentación láctica, incluyendo el efecto de operaciones preliminares (neutralización y del cultivo) y el empleo de otros cultivos para la fermentación.
- El séptimo capítulo presenta el seguimiento del proceso fermentativo mediante la determinación de propiedades fisicoquímicas y microbiológicas.
- El octavo capítulo contiene los resultados de la evaluación de la vida útil de una mezcla fermentada, obtenidos a partir del seguimiento de las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas.
- Finalmente, en el noveno capítulo, se establecen las conclusiones y perspectivas o recomendaciones de esta tesis doctoral.

El trabajo se desarrolló en los Laboratorios de análisis fisicoquímico y microbiológico de alimentos del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA) de la Universidad Nacional de Colombia, y en el Laboratorio de antioxidantes naturales de la Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Industrial de Barcelona (ETSEIB) de la Universitat Politècnica de Catalunya. Fue financiado por la División de Investigación de la Sede de Bogotá de la Universidad Nacional de Colombia por medio del proyecto “*Generación de valor en matrices vegetales mediante la aplicación de fermentación láctica*”.

1. Introducción

1.1 Fermentación láctica

La fermentación láctica es uno de los procesos más empleados para la conservación de alimentos. Su efectividad se relaciona con la formación de metabolitos, ácidos orgánicos, etanol, dióxido de carbono y bacteriocinas, en combinación con un descenso en la actividad de agua. El efecto de estos metabolitos se refuerza con la interferencia microbiana, ya que inhiben el crecimiento de ciertos microorganismos contaminantes, mientras otros proliferan en el mismo sustrato. Sin embargo, con el fin de que esta interferencia sea efectiva, la flora a inhibir debe ser superada por la flora adicionada (Caplice, 1999; Paul Ross *et al.*, 2002; Devlieghere *et al.*, 2004; Bourdichon *et al.*, 2012).

El mecanismo de acción incluye diferentes factores: la obstrucción del mantenimiento del potencial de la membrana celular (el cual inhibe el transporte activo, reduciendo el pH intracelular y diferentes funciones metabólicas), la competencia por nutrientes, la generación de un ambiente desfavorable y la competencia por adhesión. Por ello, otro beneficio de la fermentación láctica se relaciona con el mejoramiento de la seguridad del alimento a través de la inhibición de patógenos y del crecimiento de esporas (Caplice, 1999; Paul Ross *et al.*, 2002; Devlieghere *et al.*, 2004; Bourdichon *et al.*, 2012; da Silva Sabo *et al.*, 2014).

Además de mejorar la conservación de los alimentos, la fermentación láctica proporciona otros beneficios como la transformación de las características sensoriales (aroma, sabor y textura), el incremento de la calidad nutricional (ya que se favorece la digestibilidad de algunos nutrientes) y efectos específicos en la salud (como es el caso de los microorganismos probióticos, vitaminas y minerales). Por lo anterior, tanto el mejoramiento de la calidad organoléptica como del valor nutricional del alimento se consideran objetivos en algunos procesos fermentativos (Caplice, 1999; Bourdichon *et al.*, 2012; Hugenholtz, 2013).

Adicionalmente, puede considerarse la fermentación como un proceso tradicional, enmarcado en la sostenibilidad, naturalidad y de conservación no térmica, que favorece el aumento de la actividad antioxidante gracias al rompimiento de paredes celulares, ya que se generan metabolitos secundarios y se liberan otros compuestos almacenados en las estructuras internas (Caplice, 1999; Bourdichon *et al.*, 2012; Hugenholtz, 2013).

Los cultivos iniciadores (con cepas definidas), especialmente los empleados a gran escala, tienen un componente importante de diseño que se obtiene gracias a los avances en genética y biología molecular. La atención se focaliza en los microorganismos asociados con impactos positivos en la salud y con el respaldo científico que su uso debe tener. Con el fin de alcanzar estos beneficios deben tenerse en cuenta los siguientes factores en la selección del cultivo, ya que el tipo y las características de los microorganismos son determinantes para la obtención de las características deseadas en el alimento (Paul Ross *et al.*, 2002; Leroy *et al.*, 2006; Cogan *et al.*, 2007; Parra-Huertas, 2010):

- Adición de promotores de crecimiento, tolerancia al oxígeno presente, perfil de acidificación y estabilidad.
- Velocidad de crecimiento, por ejemplo, en algunos casos se esperan valores hasta de 10^6 - 10^7 UFC/mL con un inóculo entre el 1 y el 10% (p/p) en 24h, mientras que en otros estas concentraciones se obtienen luego de varios días de proceso.
- Tipo de alimento: acidificación, aroma, estabilidad y textura.
- Obtención de características organolépticas aceptables para el consumidor y el mantenimiento del perfil aromático.
- Contenido de microorganismos viables mínimo de 10^6 UFC/g de producto al final del tiempo de vida útil del alimento, aunque en algunas fuentes se reportan mayores concentraciones como Lourens (Lourens-Hattingh and Viljoen, 2001).

Adicional a la inclusión de microorganismos probióticos, los alimentos funcionales pueden complementarse con prebióticos (sustancias que favorecen el crecimiento y la actividad de las bacterias a lo largo del tracto digestivo), los cuales se conocen como alimentos simbióticos y son objeto de diversos estudios (Llc, 2003; Cogan *et al.*, 2007; Mussatto and Mancilha, 2007; Park and Floch, 2007; Oliveira *et al.*, 2012; Vijaya Kumar *et al.*, 2015).

Algunas bacterias lácticas poseen características probióticas. Por ejemplo, (1) tolerancia a ácidos y bilis, que es esencial para mantener el número de células viables durante el almacenamiento y en el paso a través del tracto digestivo después de la ingestión oral; (2) adherencia a la mucosa intestinal humana, necesaria para la colonización temporal del tracto gastrointestinal humano; (3) producción de sustancias antimicrobianas, importante para la conservación del alimento y la inhibición de patógenos (Gomes and Malcata, 1999; Granato *et al.*, 2010).

1.1.1 Bacterias ácido lácticas

Estos microorganismos son Gram positivos, mesófilos, con temperaturas de crecimiento entre 20 y 60°C y pH entre 4,0 y 6,5. El proceso fermentativo generalmente es anaerobio, pero las bacterias también pueden crecer en presencia de oxígeno. Algunos requerimientos para su crecimiento son: fuentes de carbono (presente en forma de azúcares, aminoácidos y ácidos orgánicos), nitrógeno (disponible en aminoácidos, péptidos y compuestos inorgánicos) minerales (Mg, Mn y Fe en forma de sales) y vitaminas. Cabe destacar que en algunos casos las bacterias lácticas pueden crecer, mantenerse, conservar y proporcionarle al alimento características probióticas sin la generación de ácido láctico (Caplice, 1999; Vijayakumar *et al.*, 2008; Parra-Huertas, 2010; Castillo Martinez *et al.*, 2013; Ghaffar *et al.*, 2014).

Para el mantenimiento de las bacterias lácticas es indispensable contar con una reserva permanente de energía. En el caso de los alimentos, este suministro se realiza a partir de los carbohidratos, especialmente glucosa, que son la fuente de carbono más disponible (Mckee and Mckee, 2014).

Dentro de estas rutas se destaca la glucólisis (vía Embden–Meyerhof–Parnas), en la que la glucosa se transforma en ácido pirúvico. A partir de este ácido, si los microorganismos son anaerobios, puede producirse etanol, ácido láctico, ácido acético o moléculas semejantes. En el caso de microorganismos aerobios el ácido pirúvico se oxida completamente produciendo CO₂ y agua. Otra ruta metabólica importante es la denominada vía de las pentosas fosfato, en la que a diferencia de la glucólisis, no se genera ATP. Los principales productos son NADPH y ribosa-5-fosfato y se obtienen en dos etapas, una oxidativa y otra no oxidativa (Mckee and Mckee, 2014).

De acuerdo con los productos obtenidos en la fermentación, las bacterias ácido lácticas pueden clasificarse como homofermentativas, si se produce únicamente ácido láctico, o heterofermentativas, si se tienen otros productos adicionales al ácido láctico, como CO₂, etanol y ácido acético, entre otros (Caplice, 1999; Vijayakumar *et al.*, 2008; Parra-Huertas, 2010; Abdel-Rahman *et al.*, 2011; Castillo Martinez *et al.*, 2013).

Las bacterias homofermentativas emplean la glucólisis como ruta metabólica (por ejemplo: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*), mientras que las bacterias heterofermentativas emplean la vía de las pentosas en combinación con glucólisis (por ejemplo: *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus reuteri*) Dentro de los compuestos obtenidos en el proceso heterofermentativo que aportan un perfil sensorial específico están: acetaldehído, citratos, dióxido de carbono, amoníaco, ácidos grasos libres y ácidos orgánicos (acético, propiónico e isobutírico) (Caplice, 1999; Cogan *et al.*, 2007; Parra-Huertas, 2010; Abdel-Rahman *et al.*, 2011; Castillo Martinez *et al.*, 2013).

Las rutas metabólicas también se ven afectadas significativamente por la presencia de otros microorganismos. Uno de los casos más documentados es el metabolismo del *Streptococcus thermophilus* que se ve influenciado por la presencia de *Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus*, en la fermentación de leche para la obtención de yogur. En este proceso se observa un efecto positivo, al emplear cultivos mixtos en comparación con monocultivos, en cuanto al crecimiento y mantenimiento, la acidificación, la proteólisis y la producción de sabores. Esta simbiosis se caracteriza por el hecho de que cada bacteria produce una o más sustancias que estimulan el crecimiento de la otra mediante los siguientes fenómenos (Béal *et al.*, 1994; Lourens-Hattingh and Viljoen, 2001; Oliveira *et al.*, 2012):

- Crecimiento más rápido del *Streptococcus* en relación con el *Lactobacillus*. El *Lactobacillus bulgaricus* es estimulado por el ácido fórmico y el CO₂ producidos por la descarboxilación de la urea por la ureasa del *Streptococcus thermophilus*, mientras que es favorecido por los aminoácidos y pequeños péptidos obtenidos a partir de la actividad metabólica del *Lactobacillus bulgaricus*.

- Consumo parcial de lactosa acompañado de la formación de ácido láctico como producto principal. Aunque el *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, metaboliza

preferentemente lactosa, también emplea glucosa, fructosa y manosa, en una menor proporción.

- Liberación de galactosa y acumulación de diacetilo y acetoína en el medio.

1.1.2 Fermentación de vegetales

Muchos de los productos con características probióticas disponibles en el mercado colombiano son de origen lácteo. Debido a algunas desventajas como su contenido de colesterol y de lactosa, se observa un crecimiento en la demanda de productos funcionales no lácteos, por lo que se valora la posibilidad del empleo de frutas y hortalizas como vehículo para microorganismos probióticos. La investigación para el desarrollo de este tipo de productos se concentra en alcanzar la supervivencia de un número alto de microorganismos y una mínima alteración de las características sensoriales de los alimentos (Granato *et al.*, 2010; Rivera-Espinoza and Gallardo-Navarro, 2010; Di Cagno *et al.*, 2013).

Por otra parte, la población microbiana en productos vegetales varía de acuerdo con el vegetal, la composición química, la capacidad tampón del alimento, la competencia generada entre las cepas presentes y las condiciones de poscosecha. También se observan variaciones en la población microbiana con la maduración del fruto y en muchos casos se presenta una sucesión de cepas. Por lo tanto, para obtener las propiedades deseables de los productos vegetales fermentados, es necesario controlar las condiciones del proceso fermentativo o reducir la carga microbiana inicial e inocular los microorganismos aislados previamente, ya que como ocurre en la fermentación de otros tipos de alimentos, la composición de la microbiota y su desarrollo, son factores importantes para la calidad del producto final (Rodríguez *et al.*, 2009; Parra-Huertas, 2010; Di Cagno *et al.*, 2013).

Debe considerarse que las fermentaciones espontáneas resultan de las actividades competitivas de una variedad de microorganismos: los que mejor se adaptan a las condiciones durante el proceso de fermentación tienden a dominar. Por ello, los riesgos son altos: (1) inadecuada inhibición de esporas y patógenos, (2) generación de componentes aromáticos y nutricionales indeseables (Rodríguez *et al.*, 2009; Parra-Huertas, 2010; Di Cagno *et al.*, 2013).

Se proponen dos alternativas para dirigir o encaminar la fermentación de frutas y hortalizas, que deben complementarse con tratamientos térmicos del sustrato (Rodríguez *et al.*, 2009; Di Cagno *et al.*, 2013):

- El empleo de microorganismos nativos, que se encuentran de forma natural en el alimento, por lo que se requiere un aislamiento de la cepa de interés para evitar contaminaciones y poder inocularla nuevamente en la misma matriz de forma posterior al tratamiento térmico.
- El empleo de microorganismos provenientes de otras matrices (alóctonos) que permiten fermentar diversos tipos de alimentos. Dentro de este grupo se pueden encontrar los cultivos iniciadores.

Sin embargo, cabe resaltar que en diferentes culturas se realizan fermentaciones espontáneas controlando la acción de la microflora nativa por medio de las condiciones de proceso (temperatura), la adición de sal o azúcar para aumentar la presión osmótica y/o la inclusión de especias o aromáticas con compuestos antimicrobianos (entre otros: canela, clavos, romero, tomillo). En la Tabla 1-1 se presentan algunos ejemplos de fermentación láctica en alimentos de origen vegetal.

Tabla 1-1 Ejemplos de fermentación láctica aplicados en alimentos de origen vegetal.

Matriz	Cepas	Referencia
Col, lechuga y ajo (Kimchi)	<i>Weissella confuse</i> y <i>Lactobacillus plantarum</i>	(Yang <i>et al.</i> , 2014)
Zanahorias, habichuelas y calabacines	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Weissella soli</i> , <i>Weissella koreensis</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i> y <i>Lactobacillus fermentum</i>	(Di Cagno <i>et al.</i> , 2008)
Cereza y brocoli	<i>Lactobacillus spp.</i>	(Filannino <i>et al.</i> , 2015)
Tomate	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	(Nazzaro <i>et al.</i> , 2009)
Cerezas, piña, zanahoria y tomate	<i>Lactobacillus plantarum</i>	(Filannino <i>et al.</i> , 2014)
Lechuga y manzana	<i>Lactobacillus plantarum</i>	(Siroli <i>et al.</i> , 2015)
Pimienta	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus curvatus</i> y <i>Weissella confusa</i>	(Di Cagno <i>et al.</i> , 2009)
Aceitunas verdes	<i>Lactobacillus pentosus</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> y <i>Candida diddensiae</i>	(Caplice, 1999)
Yuca (Gari)	<i>Lactobacillus plantarum</i>	(Panagou <i>et al.</i> , 2008; Di Cagno <i>et al.</i> , 2013)

- *Efecto de los ácidos orgánicos sobre los microorganismos*

Debido a que las frutas y las hortalizas tienen un mayor contenido de ácidos orgánicos (y un bajo pH) en comparación con los lácteos y cárnicos, se debe considerar su efecto sobre los microorganismos, en especial sobre las bacterias lácticas.

Los ácidos orgánicos se emplean frecuentemente como agentes antimicrobianos para aumentar la vida útil de los alimentos con un pH cercano a la neutralidad (lácteos y cárnicos). El mecanismo de acción se suele relacionar con el equilibrio existente dentro de la célula, que altera la glucólisis, el transporte de nutrientes y el metabolismo celular que se produce en medio acuoso cercano a la neutralidad, por acción enzimática. Por ejemplo, los grupos amino y carboxilo de los aminoácidos y los grupos fosfato de los nucleótidos, funcionan como ácidos débiles por lo que su estado iónico depende del pH del medio. (Brown *et al.*, 1993; Nelson and Cox, 2004).

El efecto de la acidificación del medio depende de la concentración y del tipo de ácido, que a su vez determinan el pH. Debe considerarse el efecto de la disociación de los ácidos orgánicos presentes, ya que la forma no disociada del ácido puede pasar a través de la membrana celular, en donde altera el equilibrio del pH intracelular al disociarse. Este cambio en pH intracelular puede producir un aumento en la concentración de aniones, lo que a su vez desencadena un aumento en los niveles de Na⁺ y K⁺ y en la presión de las membranas celulares. Por lo tanto, los ácidos débiles tienen un mayor efecto como agentes antimicrobianos, ya que en los ácidos fuertes no existe una forma no disociada en solución (Nelson and Cox, 2004).

En medio acuoso las diferentes especies de los ácidos orgánicos (disociadas o no) se encuentran en equilibrio. Este equilibrio se ilustra en la ecuación 1.1, cuya constante de equilibrio se define de acuerdo con las concentraciones de diferentes las especies, y se conoce como constante de disociación del ácido (Brown *et al.*, 1993; Nelson and Cox, 2004):



Al igual que para todas las reacciones químicas, la disociación de los ácidos orgánicos se rige por el principio de Le Châtelier (cuando se altera el equilibrio, éste se desplaza para

contrarrestar el sentido de la variación). Por lo tanto, la disociación del ácido depende del pH del medio; es decir, al bajar el pH la concentración de la especie no disociada es mayor así como su acción antimicrobiana (Brown *et al.*, 1993; Goldberg *et al.*, 2002; Nelson and Cox, 2004).

Generalmente, la constante de disociación del ácido se expresa como el negativo del logaritmo de la constante de equilibrio (pK_a). Ácidos con un valor elevado de pK_a son conservantes más efectivos, ya que a valores de pH inferiores al pK_a predominará la especie no disociada. Si el ácido es diprótico o triprótico cada disociación tendrá su respectiva constante de equilibrio. La Tabla 1-2 recoge algunas de estas disociaciones y presenta los valores de las diferentes constantes de disociación de algunos de los ácidos orgánicos presentes en los alimentos (Brown *et al.*, 1993; Nelson and Cox, 2004).

Tabla 1-2. Constantes de disociación de ácidos orgánicos.

Ácido	Ecuación de disociación	pKa
Acético (HA)	$HA \rightleftharpoons H^+ + A^-$	4.76
Ascórbico (H ₂ A)	$H_2A \rightleftharpoons H^+ + HA^-$	4.17
	$HA^- \rightleftharpoons H^+ + A^{2-}$	11.57
Cítrico (H ₃ A)	$H_3A \rightleftharpoons H^+ + H_2A^-$	3.13
	$H_2A^- \rightleftharpoons H^+ + HA^{2-}$	4.76
	$HA^{2-} \rightleftharpoons H^+ + A^{3-}$	6.40
Láctico (HA)	$HA \rightleftharpoons H^+ + A^-$	3.86
Málico (H ₂ A)	$H_2A \rightleftharpoons H^+ + HA^-$	3.46
	$HA^- \rightleftharpoons H^+ + A^{2-}$	5.10
Oxálico (H ₂ A)	$H_2A \rightleftharpoons H^+ + HA^-$	1.25
	$HA^- \rightleftharpoons H^+ + A^{2-}$	4.27
Succínico (H ₂ A)	$H_2A \rightleftharpoons H^+ + HA^-$	4.21
	$HA^- \rightleftharpoons H^+ + A^{2-}$	5.64

Fuente: (Brown *et al.*, 1993; Goldberg *et al.*, 2002; Nelson and Cox, 2004).

Tomando como ejemplo el ácido cítrico, por tratarse de un ácido triprótico, se consideran los equilibrios de los esquemas detallados en la Figura 1.1 y la variación de las concentraciones de las diferentes especies en solución frente al pH se ilustran en la Figura 1.2.

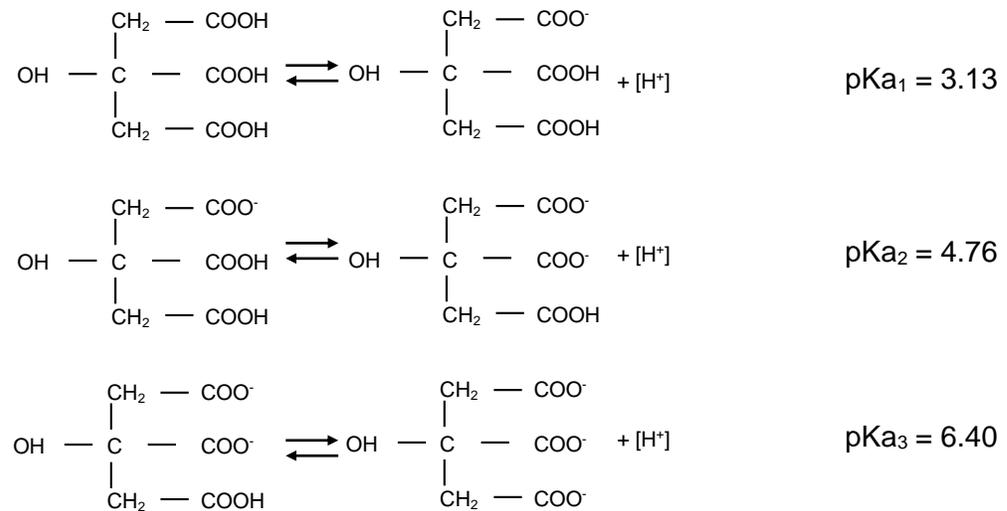


Figura 1.1: Esquema de la disociación del ácido cítrico.

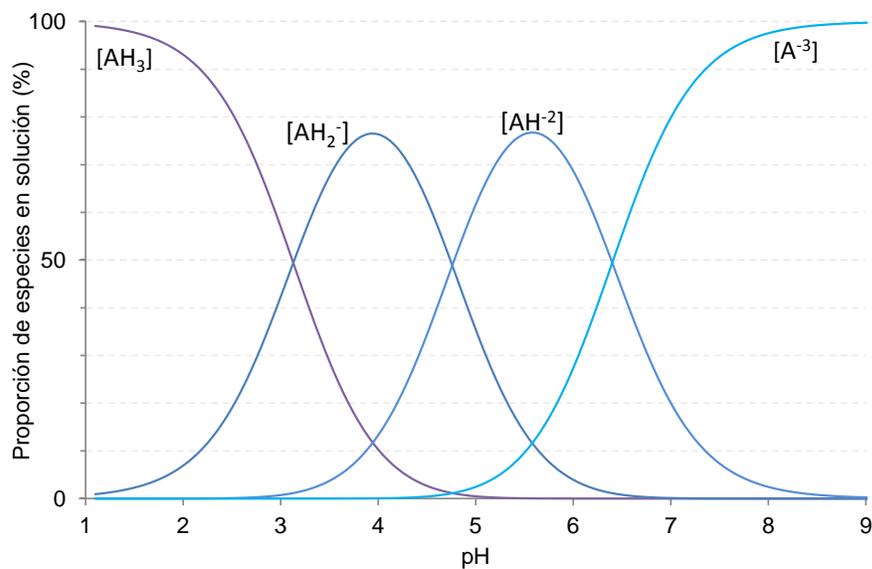


Figura 1.2: Especiación del ácido cítrico frente al pH en soluciones acuosas.

1.1.3 Los antioxidantes

Una de las justificaciones para promover el consumo diario de alimentos de origen vegetal (como frutas y hortalizas) es que son fuente de micronutrientes (vitaminas y minerales) y de compuestos con actividad antioxidante. El mecanismo de acción de estos compuestos está relacionado con la oxidación originada por procesos fisiológicos normales y patológicos (respiración, contaminación, radiación, entre otros factores), que favorecen la formación de especies reactivas, que, a su vez, producen daños celulares y

posteriormente, enfermedades (Venereo Gutiérrez, 2002; Dimitrios, 2006; Brewer, 2011; Corrales and Muñoz Ariza, 2012; Tetteh, 2012; Shahidi and Ambigaipalan, 2015).

Los compuestos con actividad antioxidante reducen o eliminan la acción de estas especies reactivas para mantener un equilibrio. Cuando se altera este balance y la generación de especies reactivas supera a los antioxidantes, se produce el estrés oxidativo. Las especies reactivas más estudiadas son las especies reactivas de oxígeno (ROS) y los radicales libres, que se caracterizan por tener uno o más electrones desapareados en su último orbital, lo que hacen que sean altamente reactivas e inestables, ya que tratan de alcanzar una configuración más estable mediante la interacción con otras moléculas, especialmente mediante reacciones de óxido-reducción. Por lo tanto, se generan reacciones en cadena (reacciones de iniciación, propagación y terminación) que solo finalizan cuando dos radicales libres se encuentran o cuando una molécula cede un electrón fácilmente, sin desestabilizarse (Venereo Gutiérrez, 2002; Dimitrios, 2006; Brewer, 2011; Corrales and Muñoz Ariza, 2012; Tetteh, 2012; Shahidi and Ambigaipalan, 2015).

En este sentido, se identifican cuatro aspectos importantes en el estudio de compuestos con actividad antioxidante (Halliwell, 2001; Naczki and Shahidi, 2006; Shahidi and Ambigaipalan, 2015):

- La identificación específica de compuestos con actividad antioxidante presentes en plantas y determinados alimentos.
- La adición de compuestos con actividad antioxidante a otros alimentos altamente sensibles a la oxidación (especialmente a la oxidación lipídica) con el fin de protegerlos frente al daño oxidativo. Dentro de esta línea de investigación se resaltan los estudios enfocados hacia los compuestos de origen natural, principalmente con el objetivo de reducir el empleo de aditivos sintéticos que podrían tener un efecto nocivo en la salud.
- El mecanismo de absorción de los compuestos con actividad antioxidante y su acción específica dentro del organismo. En esta línea destaca el estudio de los mecanismos existentes a lo largo del tracto gastrointestinal que facilitan la absorción.
- El empleo de compuestos con actividad antioxidante en tratamientos terapéuticos y cosméticos.

Los antioxidantes suelen ser metabolitos secundarios que se sintetizan en la planta o fruto como producto de un estímulo (infecciones, radiación, oxidaciones, etc.). Por ello, no están uniformemente distribuidos en la planta. Se encuentran en estructuras celulares y en múltiples ocasiones forman complejos con otras sustancias como carbohidratos, proteínas, polímeros de alto peso molecular, grasas, clorofilas, terpenos y carotenoides, entre otros. Por estas razones el extracto obtenido para el análisis de actividad antioxidante es generalmente una mezcla de todos estos compuestos (Naczk and Shahidi, 2004, 2006; Kevers *et al.*, 2007; Espinosa-Pardo *et al.*, 2014; Poveda Núñez, 2014).

La manera más habitual de determinar la actividad antirradicalaria implica una extracción previa. Los solventes (y sus combinaciones) más empleados para la extracción de compuestos con actividad antioxidantes son: metanol, etanol, acetona, agua y acetato de etilo. También se ha empezado a evaluar el empleo de dióxido de carbono, solo y en mezcla con algunos de los compuestos anteriores, para realizar la extracción en condiciones supercríticas. El método de extracción debe considerar, entre otros, factores como (Naczk and Shahidi, 2004, 2006; Kevers *et al.*, 2007; Espinosa-Pardo *et al.*, 2014; Poveda Núñez, 2014):

- Interferencias que puede tener el solvente empleado con el método de análisis.
- Reactividad entre el analito y el solvente.
- Sensibilidad del analito frente a las condiciones del proceso (temperatura o presión).
- Afinidad entre el analito y el solvente (polaridad)
- Tamaño de partícula.

Las principales técnicas analíticas empleadas para la determinación de la actividad antirradicalaria se fundamentan en la acción del compuesto desde dos puntos de vista: la transferencia de átomos de hidrógeno o de electrones. Aunque el resultado final es similar, la cinética y el potencial de reacciones secundarias difieren. En un mismo sistema pueden ocurrir los dos sistemas de reacción en paralelo, pero el mecanismo dominante será determinado por la energía de disociación y el potencial de ionización (también influyen la estructura y propiedades de los compuestos antioxidantes, el

solvente, la solubilidad y coeficiente de partición) (Huang *et al.*, 2005; Prior R.L.; Wu X., 2005; Gülçin, 2012).

En el primer caso (transferencia de átomos de hidrógeno), se mide la capacidad de un compuesto para reducir los radicales libres mediante la donación de hidrógeno. Ésta depende del solvente empleado y del pH de la solución, y se ve afectada por la presencia de agentes reductores (como metales), dando valores más altos. En el segundo caso, (transferencia de electrones) es necesario recordar conceptos de reacciones *redox* (oxidación: ganancia de electrones y reducción: pérdida de electrones), que constituyen la reacción principal en la oxidación biológica (cadena de reacciones químicas que permite proporcionar energía al cuerpo mediante la oxidación de compuestos producto de la descomposición de los alimentos) (Huang *et al.*, 2005; Prior R.L.; Wu X., 2005; Gülçin, 2012).

La Tabla 1-3 presenta los fundamentos y algunas consideraciones de las técnicas analíticas más empleadas para la determinación de la actividad antirradicalaria del extracto obtenido de los diferentes alimentos. Se diferencia de la actividad antioxidante de un alimento, ya que esta última se determina en modelos de alimentos (generalmente cárnicos o emulsiones) debido a que los componentes más susceptibles a la oxidación son los lípidos y la acción antioxidantes de todos los compuestos presentes se da se forma simultánea (Decker *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2005; Prior R.L.; Wu X., 2005; Gülçin, 2012).

Tabla 1-3. Principales aspectos de las técnicas analíticas más empleadas en la determinación de la actividad antirradicalaria.

Método	Fundamentos	Observaciones
Capacidad antioxidante equivalente de Trolox (<i>Trolox equivalent antioxidant capacity</i> – TEAC o Método ABTS)	Involucra la generación de un radical “estable” (ABTS ^{•+} : 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazoline-6-sulfonato) a partir del ácido, en presencia de peroxodisulfato. Actúan los dos mecanismos de transferencia. Lectura por espectrofotometría ($\lambda_{\max} = 734\text{nm}$) Tiempo de reacción fijo (5 - 7 min.). Se mide el porcentaje de inhibición del radical (ABTS ^{•+}). Resultados expresados en equivalentes de Trolox/masa de muestra	Funciona bien en amplios rangos de pH, el ensayo se puede realizar con agua y disolventes orgánicos, lo que permite evaluar compuestos hidrófilos y lipófilos. Cualquier compuesto que tenga un potencial redox más bajo que el de (ABTS ^{•+}) puede reaccionar positivamente lo que cuestiona la representatividad del mecanismo de acción del radical (ABTS ^{•+}) en relación con las biomoléculas presentes en un sistema biológico.

Método	Fundamentos	Observaciones
Capacidad reductora del Fe(II) (<i>Ferric Reducing Antioxidant Power - FRAP</i>)	<p>Se pueden presentar los dos mecanismos, por lo que en combinación con otras técnicas se puede identificar el mecanismo de acción dominante para diferentes alimentos.</p> <p>La transferencia de electrones se fundamenta en la capacidad que tienen los antioxidantes de reducir el Fe³⁺ a Fe²⁺ en los complejos formados con TPTZ (2,4,6-tripiridyl-s-triazine) en medio ácido (pH 3,6, para mantener la solubilidad del hierro y para aumentar el potencial redox). Lectura por espectrofotometría, ($\lambda_{\max} = 593\text{nm}$).</p>	<p>Cualquier compuesto con potencial redox menor que el del par Fe³⁺/Fe²⁺ (0.7V) puede reducir Fe³⁺ a Fe²⁺, induciendo resultados altos.</p> <p>Algunos antioxidantes reducen Fe³⁺ a una velocidad baja lo que impide su medición en el tiempo de análisis (por ejemplo, quercetina y los ácidos caféico, ferúlico y tánico) obteniendo valores menores a los reales.</p> <p>No es posible comparar la actividad antioxidante de diferentes tipos de radicales (tioles o proteínas), los que pueden reaccionar con Fe²⁺ y aquellos que contienen grupos SH.</p>
Polifenoles totales (Método Folin-Ciocalteu)	<p>Mecanismo de transferencia de electrones en medio alcalino: la formación de complejos de los compuestos fenólicos, con un reactivo de molibdeno y tungsteno, que se oxidan a pH básico formando óxido de color azul. Lectura por espectrofotometría ($\lambda_{\max} = 765\text{nm}$). Resultados expresados como equivalentes de ácido gálico (mg GAE/g de alimento)</p>	<p>Presenta múltiples interferencias (proteínas, tioles, derivados de vitaminas, algunos iones inorgánicos de hierro y magnesio, dióxido de azufre, ácidos orgánicos, algunas bases de nucleótidos, aminoácidos y azúcares, algunos solventes orgánicos), por lo que se sugiere tomar los resultados como una medida orientativa y no como el contenido de fenoles totales.</p>
Método DPPH	<p>Intervienen los dos mecanismos: transferencia de electrones como de átomos de hidrógeno. Por lo tanto es altamente sensible al solvente empleado y al pH del medio. Los resultados se obtienen en relación con la cantidad de antioxidante necesaria para disminuir la cantidad del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH[•]) en un 50% de su valor inicial. A menores valores, mayor será la actividad antirradicalaria. Lectura por espectrofotometría ($\lambda_{\max} = 515\text{nm}$). Resultados expresados como equivalentes Trolox/masa de muestra</p>	<p>Empleando soluciones acuosas de etanol (no menores de 50% v/v) permite evaluar la actividad de compuestos hidrofílicos y lipofílicos.</p> <p>Algunas desventajas son: la interferencia con otras sustancias que pueden absorber la luz a la misma longitud de onda (carotenoides) o que tengan una alta turbidez. Muchos antioxidantes que reaccionan rápidamente con radicales peroxilo pueden reaccionar lentamente o incluso ser inertes al (DPPH[•]).</p>
Capacidad de absorbancia del radical de oxígeno (<i>Oxygen Radical Absorbance Capacity - ORAC</i>)	<p>Mecanismo de la transferencia átomos de hidrógeno: el radical 2,2-azobis (2-amidino-propano) dihidrocloruro (AAPH) genera el radical peroxilo (ROO[•]), que, en presencia de un antioxidante, capta un átomo de hidrógeno del antioxidante (AH), originando un compuesto hidroperóxido (ROOH) y un radical antioxidante estable (A[•]).</p> <p>Se considera el área bajo la curva del antioxidante en comparación con el blanco. Los resultados se expresan como equivalentes de Trolox.</p>	<p>El método ORAC se aplica para medir la actividad antirradicalaria en muestras biológicas y de alimentos.</p> <p>La reacción es seguida por pérdida de fluorescencia por periodos de tiempo largo (1h y 30min aproximadamente) para tener en cuenta los efectos de metabolitos secundarios.</p> <p>El método permite cuantificar compuestos hidrofílicos y lipofílicos haciendo ajustes en los solventes empleados.</p>

Fuente: (Huang *et al.*, 2005; Kuskoski *et al.*, 2005; Prior R.L.; Wu X., 2005; Magalhães *et al.*, 2008; Everette *et al.*, 2010; Gülçin, 2012).

- *Efecto de la fermentación sobre los antioxidantes*

Tal como se mencionó previamente, los antioxidantes son metabolitos secundarios y forman parte de la estructura celular. Por lo tanto, se considera que la fermentación láctica puede inducir una degradación de las estructuras celulares, generando liberación y/o síntesis de compuestos bioactivos que aumentaría la capacidad antioxidante del alimento. Sin embargo, estos cambios también pueden darse como parte de procesos enzimáticos o de maduración de los frutos, por la adición de otros compuestos presentes en algunas fermentaciones o por el procesamiento del alimento previo a la fermentación. Se sugieren diferentes mecanismos que podrían aumentar la actividad antioxidante (Hur *et al.*, 2014; Septembre-Malaterre *et al.*, 2018):

- **Actividad enzimática:** algunas enzimas generadas por la actividad microbiana (glucosidasa, amilasa, celulasa, quitinasa, ininasa, fitasa, xilanasas, tanasa, esterasa, invertasa o lipasa) pueden hidrolizar compuestos estructurales y así debilitar las paredes celulares de la planta, lo que favorece la liberación de compuestos antioxidantes, por ejemplo, flavonoides.
- **Cambios estructurales:** en algunos compuestos la capacidad antioxidante aumenta al producirse cambios en la estructura de algunos compuestos. Es el caso de los fitoquímicos, en los que las bacterias lácticas contribuyen a una conversión fenólica simple y a la despolimerización de compuestos fenólicos de alto peso molecular. En la soya, la actividad antioxidante aumenta después de fermentar los productos, debido a que se presenta una conversión de las isoflavonas glicosiladas.
- **Acción de metabolitos:** algunos de los metabolitos producidos como parte de la actividad metabólica de los microorganismos (como el ácido láctico o el etanol) ocasionan una hidrólisis ácida o alcohólica en la que se debilitan la estructura o rompen las paredes celulares liberando los compuestos bioactivos.
- **Actividad antioxidante de los microorganismos en sí mismos.** Algunas bacterias ácido lácticas tienen, como parte de su actividad metabólica, habilidades quelantes, de inhibición de la peroxidación lipídica (por su captación de radicales hidroxilo y poder reductor), así como mecanismos antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, que se liberan para protegerse del daño oxidativo al exponerse a especies reactivas de oxígeno.

Sin embargo, se presentan casos en los que la actividad antioxidante del sustrato disminuye con la fermentación, como por ejemplo, la fermentación del té verde y de las aceitunas. La actividad antioxidante disminuye significativamente, en el primer caso debido a una oxidación de los compuestos bioactivos y en el segundo caso debido a la degradación de los compuestos fenólicos (Hur *et al.*, 2014; Septembre-Malaterre *et al.*, 2018).

Otra propiedad que puede afectar la actividad antioxidante de un sustrato durante la fermentación es el pH. Teniendo en cuenta que el pH de cada proceso fermentativo está definido por el sustrato y el tipo de microorganismo empleado, su efecto sobre los antioxidantes del alimento será diferente. Pueden identificarse algunas de las relaciones entre el pH y la actividad antioxidante del alimento (Friedman and Jürgens, 2000; Lemańska *et al.*, 2001; Hur *et al.*, 2014):

- La actividad antioxidante de algunos compuestos depende fuertemente de la estructura. Por ejemplo, las antocianinas, cuya estructura solo es estable a bajos valores de pH. Las catequinas (presentes en el té verde), son estables a pH ácidos y muy inestables a pH alcalinos, aunque su actividad antioxidante aumenta cuando se presenta desprotonación, debido a un aumento en la capacidad de donación de electrones.
- La presencia de compuestos antioxidantes puede incentivar el metabolismo de los microorganismos, tal y como ocurre al emplear *Lactobacillus plantarum*, el cual es estimulado por la presencia de quercetina favoreciendo la fermentación láctica. Por lo tanto, algunos antioxidantes serán “consumidos” durante la fermentación.
- La actividad antioxidante también depende del número y de la posición de los radicales hidroxilo en la molécula y de su estado de protonación, que depende, a su vez, del pKa, del pH del medio y de los posibles puentes de hidrógeno.

Los tratamientos térmicos son una de las principales operaciones aplicadas en los diferentes procesos de conservación y transformación de los alimentos, ya que garantizan la seguridad y la disminución de la carga microbiana y de la actividad enzimática. Se emplean de forma preliminar a una fermentación para asegurar la calidad del proceso. Sin embargo, la actividad antioxidante puede afectarse, por lo que es importante determinar si la reducción en las propiedades bioactivas es relevante en

relación con los beneficios obtenidos por el tratamiento (Rawson *et al.*, 2011; Rinaldi *et al.*, 2013; Prior *et al.*, 2016; Hidalgo and Zamora, 2017).

Por ejemplo, se emplea el escaldado para reducir la carga microbiana, inactivar enzimas, conservar el color y algunas propiedades nutricionales, a pesar de que el contenido de compuestos bioactivos puede disminuir. En otros procesos (como la pasterización y la esterilización), a pesar de que su temperatura es más elevada, el tiempo es mucho más corto, por lo que los compuestos con actividad antioxidante permanecen estables o incluso pueden aumentar. En conclusión, el efecto del proceso térmico aplicado dependerá también de sus condiciones específicas. (Nicoli *et al.*, 1997; Rawson *et al.*, 2011; Rinaldi *et al.*, 2013; Nayak *et al.*, 2015; Prior *et al.*, 2016; Hidalgo and Zamora, 2017; Wolf Tasca Del'Arco and Sylos, 2017).

Al igual que el pH, la temperatura empleada durante la fermentación también está definida por el tipo de microorganismo empleado. El mantenimiento de la temperatura óptima definida para el microorganismo favorece su crecimiento y metabolismo. Si durante el proceso fermentativo se sintetizan compuestos con actividad antioxidante (por ejemplo, polifenoles), ligeros incrementos en la temperatura aumentan la producción, ya que la viscosidad del medio de fermentación disminuye, se acelera el movimiento molecular incrementando la disolución, la difusión y la estabilidad de los compuestos. Adicionalmente, la capacidad de eliminación de radicales de los fenoles aumenta con el aumento de la temperatura, ya que se tiene más energía cinética y el grupo OH⁻ de los fenoles se vuelve más lábil y el átomo de H⁺ se disocia fácilmente. Las velocidades de las reacciones químicas se aceleran al aumentar la temperatura por el movimiento más rápido de los átomos, por lo que la liberación de compuestos antioxidantes se acelera por el aumento de la degradación de las paredes celulares (Ajila *et al.*, 2011; Acosta-Estrada *et al.*, 2014; Hur *et al.*, 2014).

En conclusión, no es posible predecir el efecto de la fermentación láctica sobre la actividad antirradicalaria de los alimentos fermentados, ya que depende: (1) del sinergismo entre los compuestos fenólicos, (2) de los diferentes constituyentes del alimento (en este caso de la fruta y/o hortaliza), (3) del tipo de microorganismos empleados, (4) del pH, (5) la temperatura, (6) del tiempo del proceso y (7) de las

condiciones aeróbicas (Naczk and Shahidi, 2006; Hur *et al.*, 2014; Septembre-Malaterre *et al.*, 2018).

1.1.4 Modelos de cinéticas de fermentación

El propósito de modelar un proceso fermentativo se enfoca en la descripción de los fenómenos involucrados para predecir el efecto de las variaciones de los diferentes parámetros sobre comportamiento del proceso. Sin embargo, la cinética celular es el resultado de muchas interacciones de reacciones químicas y bioquímicas y fenómenos de transporte que se desarrollan en sistemas de múltiples fases y componentes.

Adicionalmente, debe considerarse la dinámica del proceso, ya que se trata de una mezcla heterogénea de células jóvenes y viejas, que cambia continuamente debido a que las condiciones físicas y químicas también están cambiando. Por esta complejidad, es muy difícil lograr un modelamiento matemático preciso de la cinética de crecimiento. Para simplificarlo, se consideran diferentes enfoques del proceso fermentativo y algunas suposiciones para poder realizar simplificaciones que lo faciliten.

De acuerdo con el proceso fermentativo, el modelo empleado puede analizar lo que ocurre en el sustrato (fenómenos de transporte de nutrientes y metabolitos en las diferentes fases: gas, líquido y sólido) y/o en el microorganismo (rutas metabólicas) (Alcón Martín, 1999; Dutta, 2008).

Desde el punto de vista del cambio en el sustrato debe considerarse el balance de materia y energía, los procesos de crecimiento y mantenimiento celular y la dependencia entre el crecimiento microbiano y la concentración y composición del medio de cultivo. Dentro de los fenómenos más importantes para el modelamiento de la fermentación se encuentran (Alcón Martín, 1999):

- La transferencia de oxígeno hasta el microorganismo, especialmente cuando el proceso es aerobio. Se considera: (1) la transferencia desde el seno del gas, (2) el paso por la interfase del sustrato, (3) la transferencia dentro del sustrato hasta la superficie del microorganismo y (4) el transporte hasta el interior de la célula.
- Dinámica de las propiedades fisicoquímicas, principalmente cuando el cambio se produce por acción de los microorganismos. Por ejemplo, en el caso de la

producción de exopolisacáridos, donde la viscosidad del medio aumenta con el proceso fermentativo, se altera el transporte de nutrientes y la transferencia de calor en el sistema.

- Efecto de las condiciones hidrodinámicas. Si el proceso fermentativo requiere de agitación constante (indispensable para procesos aerobios) los microorganismos pueden verse afectados por los estímulos frecuentes, lo cual puede afectar su metabolismo y el resultado de la fermentación.

También se considera el sistema empleado para el proceso de fermentación: si es un proceso discontinuo (*batch*), continuo o discontinuo alimentado (*Fed-batch*), ya que esto influye en el crecimiento microbiano. Para un proceso discontinuo (tal como el que se consideró en el presente trabajo) pueden identificarse cuatro etapas de crecimiento que se ilustran en la Figura 1.3 (Doran, 1995; Villadsen *et al.*, 2011):

- Fase de latencia o fase lag: durante este periodo los microorganismos inoculados se adaptan a las condiciones del medio, empieza el consumo de sustrato debido a un ajuste metabólico y de reparación celular. La velocidad específica de crecimiento (μ) es aproximadamente igual a cero.
- Fase exponencial: se observa la mayor reproducción celular mediante un crecimiento de los microorganismos, a una velocidad máxima (μ) y constante. Su duración depende de la concentración del sustrato limitante y de los productos obtenidos por el metabolismo, de la temperatura y de características genéticas del organismo que determinan, por ejemplo, su habilidad para adaptarse a los nutrientes disponibles o a los metabolitos producidos.
- Fase estacionaria: el sustrato se agota y debido a que la velocidad de reproducción y de muerte son semejantes, se observa un mantenimiento (gracias a la actividad celular y metabólica) en la población de los microorganismos presentes en el medio. La velocidad específica de crecimiento (μ) es aproximadamente igual a cero.
- Fase de muerte: Se terminan las fuentes energéticas disponibles y la concentración de metabolitos tóxicos para la célula es alto; el número de células decrece y se presenta la lisis celular. La velocidad específica de crecimiento (μ) será menor de cero.

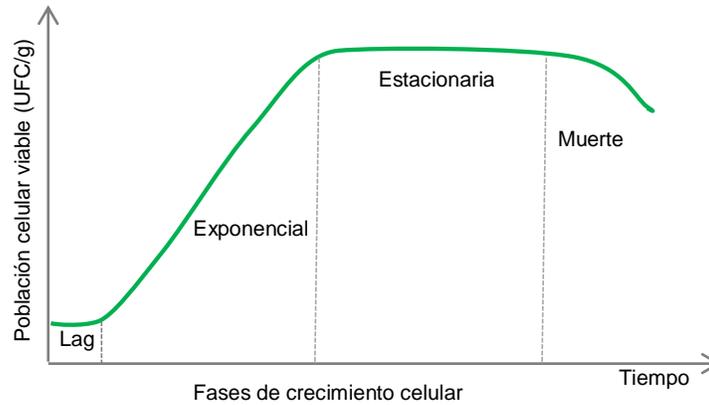


Figura 1.3: Crecimiento microbiano en un proceso fermentativo discontinuo.

Fuente: (Doran, 1995; Dutta, 2008).

Desde el punto de vista de los cambios que ocurren dentro del microorganismo es importante reconocer las diferentes rutas metabólicas, que son específicas para cada microorganismo y para cada proceso. Las generalidades se han discutido previamente.

Sin embargo, es importante resaltar la complejidad del modelamiento: cada ruta está compuesta por una serie de reacciones en cadena, generalmente enzimáticas, de diferentes tipos (oxidaciones, reducciones, de síntesis, etc.), que pueden verse afectadas por las condiciones del proceso (temperatura, especialmente), por fenómenos de difusión, por la presencia de otras moléculas y por las otras rutas metabólicas que el microorganismo realiza de forma simultánea. Se consideran balances específicos para las fuentes de carbono, de nitrógeno, otros nutrientes fundamentales (hierro, sodio, fósforo, azufre, etc.), síntesis de proteínas, ácidos nucleicos y enzimas, entre otros (Alcón Martín, 1999).

Con el fin de simplificar esta complejidad el microorganismo se considera como un catalizador. Sin embargo, a diferencia de un catalizador, parte del sustrato consumido se destina para el crecimiento de la biomasa, lo cual afecta el modelamiento. Los diferentes modelos cinéticos pueden clasificarse de acuerdo con su complejidad y el detalle de las descripciones en cuanto al metabolismo de los microorganismos así (Alcón Martín, 1999; Villadsen *et al.*, 2011):

- Modelo cinético no estructurado – no segregado: es el más simple. Se considera a los microorganismos como un único componente.
- Modelo metabólico. Considera rutas metabólicas simplificadas, en especial de la fuente de carbono, con relaciones estequiométricas definidas.

- Modelo estructurado o de célula. Propone rutas metabólicas simplificadas, incluyendo la fuente de nitrógeno. Se describe el crecimiento mediante esquemas simplificados, la biomasa como una mezcla de varias especies y se incluyen compuestos intracelulares.
- Modelo químicamente estructurado. Se consideran las especies presentes en la biomasa y se describe el metabolismo microbiano suponiendo una red de reacciones.
- Modelo segregado. Es el más complejo, ya que considera la variación de las propiedades dentro de la biomasa.

La Tabla 1-4 recoge los principales modelos no estructurados propuestos en la literatura para el crecimiento microbiano en diferentes procesos fermentativos. Estos se ajustan bien a los procesos en los que la composición microbiana es estacionaria a lo largo del proceso fermentativo; es decir, su variación es poco significativa o nula.

Tabla 1-4. Modelos matemáticos empleados para describir el crecimiento microbiano.

Modelos de crecimiento microbiano	Parámetros y variables	Consideraciones
Malthus $\frac{dC_x}{dt} = \mu C_x$	μ : velocidad de crecimiento C_x : concentración de biomasa.	Solo puede aplicarse para la fase de crecimiento exponencial
Ecuación logística $\frac{dC_x}{dt} = \mu C_x \left[1 - \frac{C_x}{C_{xmax}} \right]$	C_{xmax} : concentración de biomasa máxima.	Describe las tres fases del crecimiento microbiano: latencia, exponencial y estacionaria.
Blackman $\frac{dC_x}{dt} = \mu C_x C_s$	C_s : Concentración del sustrato limitante	Considera el efecto de la disponibilidad de un sustrato específico
M'Kendrick y Pai $\frac{dC_x}{dt} = -Y_{xs} \frac{dC_s}{dt}$	Y_{xs} : rendimiento (UFC/g sustrato)	Propone una relación entre la velocidad de consumo del sustrato y la producción de biomasa.
Tiesser $\frac{dC_x}{dt} = \mu \left[1 - \exp\left(-\frac{C_s}{K}\right) \right] C_x$	K : constante de saturación	Considera el efecto del sustrato límite sobre el crecimiento y la inhibición por sustrato
Monod $\frac{dC_x}{dt} = \frac{\mu C_s}{K_s + C_s} C_x$	K_s : constante de saturación	Es el más empleado por su simplicidad y amplia aplicación.
Haldane	C_{S0} : concentración inicial de sustrato K_s : constante de saturación	Considera la capacidad de los microorganismos para adaptarse al medio.

Modelos de crecimiento microbiano	Parámetros y variables	Consideraciones
$\frac{dC_x}{dt} = \mu_{max} \frac{C_{s0} + \frac{C_{x0} - C_x}{Y_{xs}}}{K_s + C_{s0} + K_i \left(C_{s0} + \frac{C_{x0} - C_x}{Y_{xs}} \right)^2} C_x$	K _i : constante de inhibición por sustrato	
Moser $\frac{dC_x}{dt} = \mu_{max} \frac{\left(C_{s0} + \frac{C_{x0} - C_x}{Y_{xs}} \right)^n}{K_m + \left(C_{s0} + \frac{C_{x0} - C_x}{Y_{xs}} \right)^n} C_x$	n: parámetro experimental	Considera que la composición microbiana es constante, pero su tasa de crecimiento varía.
Contois $\frac{dC_x}{dt} = \mu_{max} \frac{C_{s0} + \frac{C_{x0} - C_x}{Y_{xs}}}{K_s C_x + C_{s0} + \frac{C_{x0} - C_x}{Y_{xs}}} C_x$	C _{s0} : concentración inicial de sustrato K _s : constante de saturación	Aplicado a procesos anaerobios donde la velocidad es controlada por la etapa de hidrólisis.
Gompertz $C_x = C_{x0} + C e^{-e^{-B(t-m)}}$	C: recuento microbiano cuando el tiempo crece (UFC/mL) B: velocidad de crecimiento (UFC/mL/h). m: tiempo para alcanzar la tasa de crecimiento específica máxima (h)	Fue diseñado para describir los procesos de mortalidad en poblaciones humanas. Sin embargo, se emplea ampliamente para el crecimiento microbiano.
Powel $\frac{dC_x}{dt} = \mu_{max} \frac{C_{s0} + \frac{C_{x0} - C_x}{Y_{xs}}}{K_s + L + C_{s0} + \frac{C_{x0} - C_x}{Y_{xs}}} C_x$	L: constante de difusión	Acopla la transferencia de masa de sustrato hacia la célula a la ecuación de Monod.
Modelos de consumo de sustrato y formación de producto	Parámetros y variables	Consideraciones
Pirt $\frac{1}{Y_{xs}} = \frac{1}{Y_{xs}^{max}} + \frac{m_s}{\mu}$	m _s : coeficiente de mantenimiento de células viables.	Propone que el sustrato es empleado para funciones asociadas o no al crecimiento, por lo que su rendimiento varía a lo largo del proceso.
Luedeking – Piret $\frac{dC_p}{dt} = n \frac{dC_x}{dt} + m C_x$	C _p : concentración del producto. n y m: constantes que dependen del pH del proceso	Considera que se pueden obtener productos asociados (primer término) o no al crecimiento (segundo término).

Fuente: (Alcón Martín, 1999; Calderón Vargas, 2017).

A continuación, se presentan algunos modelos cinéticos aplicados específicamente a la fermentación láctica con diferentes microorganismos y/o sustratos:

- Modelo de Berkman (Berkman *et al.*, 1990) para la conversión de lactosa en ácido láctico empleando un cultivo mixto de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus*

bulgaricus. El sustrato de fermentación se preparó a partir de lactosa (2%), peptona (2%) y extracto de levadura (1%). Bajo estas consideraciones se empleó la ecuación logística como modelo del crecimiento bacteriano, a partir del cual se obtienen las ecuaciones (1.2) y (1.3) para el crecimiento de las cepas específicas en co-cultivo, donde 1 = *Lactobacillus bulgaricus* y 2 = *Streptococcus thermophilus*:

$$\frac{dC_{x1}}{dt} = \mu_1 C_{x1} \left[1 - \frac{C_{x1} + C_{x2}}{C_{x1 \max} + C_{x2 \max}} \right] \quad (1.2)$$

$$\frac{dC_{x2}}{dt} = \mu_2 C_{x2} \left[1 - \frac{C_{x1} + C_{x2}}{C_{x1 \max} + C_{x2 \max}} \right] \quad (1.3)$$

- Modelo de Amrane (Amrane and Prigent, 1994) para la conversión de lactosa en ácido láctico, empleando suero como medio de cultivo y *Lactobacillus helveticus* como bacteria láctica. El sustrato se preparó a partir de suero, extracto de levadura, caseína y emulsificante. Se realizaron controles de temperatura (42°C), agitación (300 rpm) y pH (5,9, mediante adición de hidróxido de sodio). Se obtuvo la expresión (Ecuación 1.4) para el crecimiento bacteriano:

$$\frac{dC_x}{dt} = \mu_{max} \left(\frac{1}{1 + \frac{f e^{dt}}{\mu_{max} - f}} \right) C_x C_S \quad (1.4)$$

Considerando d y f como constantes propias del modelo cinético y del proceso fermentativo y un término adicional que permite ajustar los datos, en especial al final del proceso fermentativo, en sistemas discontinuos (donde el valor de μ es muy pequeño).

- Modelo de Sodini (Sodini *et al.*, 2000) considera el efecto de las interacciones en cultivos mixtos en lugar de cepas simples. El sustrato empleado es leche reconstituida al 10% w/v. Los modelos aplicados son la Ley de Malthus y la ecuación de Luedeking – Piret.
- Modelo de Burgos (Burgos-Rubio *et al.*, 2000), que aplica los modelos de Monod y de Luedeking- Piret a la fermentación láctica empleando *Lactobacillus bulgaricus*. Se determinó el efecto de múltiples variables de proceso: temperatura, pH, preparación del inóculo, concentración de lactosa y composición del sustrato. Estos mismos modelos fueron aplicados por Kwan (Kwan *et al.*, 2016, 2017) en la

fermentación láctica de residuos de alimentos con *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus casei*.

- Modelo de Aghababaie (Aghababaie *et al.*, 2015a), basado en la fermentación discontinua de suero a pH controlado, empleando bacterias lácticas (*Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*) en cultivo simple. Emplea la ecuación general (1.5), que considera los efectos de diferentes variables del proceso fermentativo. Adicionalmente considera el modelo de Luedeking – Piret para la producción de ácido láctico y que la velocidad de consumo de la fuente de nitrógeno es proporcional a la velocidad de crecimiento de la biomasa.

$$\text{Ecuación general:} \quad \frac{dX_i}{dt} = \mu_{max}^i f_T^i f_{pH}^i f_C^i f_N^i f_{La}^i f_{HLA}^i X_i \quad (1.5)$$

$$\text{Efecto de la temperatura:} \quad f_T = \frac{e^{-(\Delta E_a/RT)}}{1 + Ae^{-(\Delta G_a/RT)}} \quad (1.6)$$

$$\text{Efecto del pH:} \quad f_{pH} = \frac{C_1(pH_{opt}-pH)^2 + C_2}{(pH_{opt}-pH)^2 + C_3} \quad (1.7)$$

$$\text{Fuente de carbono:} \quad f_{SC} = \frac{C_{sc}}{C_{sc} + K_c} \quad (1.8)$$

$$\text{Fuente de nitrógeno:} \quad f_{SN} = \frac{C_{SN}}{C_{SN} + K_N} \quad (1.9)$$

$$\text{Inhibición por producto (lactato y ácido láctico):} \quad f_{La} = e^{-K_{La} \cdot C_{La}} \quad (1.10)$$

$$f_{HLA} = \left(\frac{1}{1 + e^{K_p(C_{HLA} - K_{HLA})}} \right) \quad (1.11)$$

Posteriormente, Aghababaie y colaboradores (Aghababaie *et al.*, 2015b) extendieron el modelo considerando el efecto simbiótico entre las cepas al emplearlas en co-cultivo:

$$\text{Ecuación general:} \quad \frac{dX_i}{dt} = \mu_{max}^i f_T^i f_{pH}^i f_C^i f_N^i f_{La}^i f_{HLA}^i f_j^i X_m^i \quad (1.12)$$

$$\text{Efecto del } L. \text{ bulgaricus sobre el } S. \text{ thermophilus:} \quad f_L^S = Z \frac{C_{pep}}{C_{pep} + K_{pep}} \quad (1.13)$$

$$\frac{dC_{pep}}{dt} = g_{pep} \frac{dX_m^L}{dt} + h_{pep} X_m^L - q_{pep} \frac{dX_m^S}{dt} \quad (1.14)$$

$$\text{Efecto del } S. \text{ thermophilus sobre el } L. \text{ bulgaricus:} \quad f_S^L = W \frac{C_f}{C_f + K_f} \quad (1.15)$$

$$\frac{dC_f}{dt} = g_f \frac{dX_m^S}{dt} + h_f X_m^S - q_f \frac{dX_m^L}{dt} \quad (1.16)$$

$$\text{Producción de ácido láctico: } r_p = \frac{dP}{dt} = a^S \frac{dX_m^S}{dt} + b^S X_m^S + a^L \frac{dX_m^L}{dt} + b^L X_m^L \quad (1.17)$$

- Modelo empleando la ecuación de Gompertz. En múltiples publicaciones se ha empleado este modelo para describir el crecimiento microbiano en diferentes sustratos, tal como se presenta en la Tabla 1-5.

Tabla 1-5. Modelo de Gompertz aplicado en la fermentación láctica de alimentos.

Sustrato	Microorganismos	Referencia
Zanahorias, judías verdes, calabacín	Se emplearon bacterias autóctonas y alóctonas. (<i>L. plantarum</i> , <i>P. pentosaceus</i> y <i>Leuc. mesenteroides</i>)	(Di Cagno <i>et al.</i> , 2008)
Cereza dulce	Se emplearon bacterias autóctonas (<i>L. plantarum</i> , <i>P. acidilactici</i> , <i>P. pentosaceus</i> y <i>Leuc. mesenteroides</i>)	(Di Cagno <i>et al.</i> , 2011b)
Arroz, soya, avena, cebada,	<i>Lactobacillus plantarum</i>	(Coda <i>et al.</i> , 2012)
Smoothies rojos y verdes (Mora, ciruela pasa, kiwi, papaya, hinojo)	<i>Weissella cibaria</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus sp.</i> y <i>Lactobacillus pentosus</i>	(Di Cagno <i>et al.</i> , 2011a)
Repollo	Cepas ATCC (<i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> y <i>Lactobacillus rhamnosus</i>)	(Jaiswal and Abu-Ghannam, 2013)
Caldo MRS y leche	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. johnsonii</i> , <i>L. rhamnosus</i> .	(Avonts <i>et al.</i> , 2004)
Leche descremada	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus bulgaricus</i> y <i>Bifidobacterium lactis</i> en combinación con <i>Streptococcus thermophilus</i>	(Oliveira <i>et al.</i> , 2009)
Caldo MRS, calabaza y zanahoria	<i>Lactobacillus plantarum</i>	(Sharma and Mishra, 2014)
Medio MRS	48 cepas diferentes: (<i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Weissella cibaria</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i> , <i>Lactobacillus rossiae</i> , <i>Lactobacillus curvatus</i>)	(Vitali <i>et al.</i> , 2012)

1.2 Estudio de vida útil

El tiempo de vida útil se considera como el periodo en el que un alimento es inocuo y cumple con las características nutricionales, sensoriales, químicas, físicas y microbiológicas esperadas, al almacenarse bajo las condiciones recomendadas por el fabricante. Este periodo depende de los factores ambientales (humedad, luz, oxígeno, dióxido de carbono, etc.), el envase, el empaque y las características propias del alimento (composición, pH, actividad de agua y enzimática y acidez, entre otros). Estos factores se clasifican como extrínsecos (condiciones con las que el alimento se

encuentra antes de ser consumido) o intrínsecos (influenciados por el tipo de materias primas y su calidad, la formulación del producto y su estructura) y la combinación de ambos, permite aumentar la conservación del alimento haciendo que puedan emplearse tratamientos más suaves (Kilcast and Subramaniam, 2000a; Corradini and Peleg, 2007; Giménez *et al.*, 2012).

Con el fin de determinar adecuadamente el tiempo de vida útil, es de gran importancia el establecimiento de las propiedades del alimento que definen su calidad y que son más susceptibles al deterioro. Algunos de los cambios que pueden presentarse en el alimento son (Kilcast and Subramaniam, 2000a; Corradini and Peleg, 2007; Giménez *et al.*, 2012):

- Cambios microbiológicos: dependen de (1) la carga microbiana inicial, (2) las propiedades fisicoquímicas (humedad, pH, conservantes, etc.), (3) el método de procesamiento (utilizado en la producción del alimento) y (4) su entorno externo (composición del gas que rodea, temperatura de almacenamiento).
- Cambios químicos: se presentan por reacciones internas o externas con diferentes sustancias; por ejemplo, las reacciones hidrolíticas, oxidativas y enzimáticas.
- Cambios físicos: se dan principalmente por migración de humedad (ya sea por pérdida o ganancia), de grasas y/o colorantes de un alimento a otro.
- Cambios relacionados con variaciones en la temperatura: pueden darse tanto por aumento como por descenso: pueden favorecerse los cambios microbiológicos, generalmente la velocidad de las reacciones químicas se incrementa con la temperatura, por ejemplo, los cambios en la temperatura pueden afectar las propiedades de cristalización de algunos alimentos y desestabilizar los sistemas de emulsiones.

La valoración de estos cambios se hace a través de diferentes técnicas de acuerdo con la naturaleza del alimento. El estudio de las reacciones químicas y biológicas y los cambios físicos que ocurren en los alimentos durante su procesamiento y posterior almacenamiento permite reconocer los parámetros fisicoquímicos, microbiológicos o sensoriales de mayor impacto y correlación sobre su seguridad, integridad y calidad en general, en función del tiempo. Es de vital importancia el establecimiento de cuál de estos cambios es el primero que se produce, ya que éste funcionará como indicador de

calidad del alimento y será determinante para su tiempo de vida útil (Taoukis *et al.*, 1997; Kilcast and Subramaniam, 2000b).

Sin embargo, los alimentos son sistemas dinámicos en los que se suceden diversos fenómenos que de forma seriada y/o en paralelo, por lo que definir detalladamente el impacto de cada uno sobre la vida útil sea un objetivo difícil de alcanzar. Por lo tanto, en los estudios de vida útil se busca identificar los principales fenómenos químicos y biológicos que influyen en la calidad y la seguridad de los alimentos para luego determinar reacciones y parámetros cuantificables de mayor impacto en el deterioro de estas matrices, sin involucrar el detalle de rutas metabólicas que deterioran la calidad bromatológica, microbiológica o sensorial (Labuza and Schmidl, 1985; Taoukis *et al.*, 1997).

Los procedimientos para establecer el tiempo de vida útil se basan en la obtención de modelos matemáticos que simulan el deterioro de los alimentos bajo condiciones controladas, lo que permite hacer predicciones de estabilidad en función del tiempo. El fin de la vida útil ocurre cuando un parámetro o atributo de calidad llega a un valor crítico de rechazo ya sea por especificaciones a nivel físico-químico, microbiológico o sensorial (Palazo *et al.*, 2009; Mizrahi, 2011).

Con el fin de simplificar y generalizar los fenómenos ocurridos durante el deterioro, se considera una reacción global de deterioro en función del tiempo. Por lo tanto, la disminución en la calidad del alimento podrá asumirse como la velocidad de la reacción, para una temperatura definida. Es decir, se define la velocidad de reacción o la función de calidad del alimento, como el cambio en el factor de calidad seleccionado (A) en función del tiempo (t) involucrando la constante de velocidad (k) y el orden de esta reacción global (n), tal como se ilustra en la ecuación 1.18 (Mizrahi, 2000; Salas, 2015):

$$aA \rightleftharpoons bB, \text{ luego la velocidad: } \pm \frac{dA}{dt} = k_A[A]^n \quad (1.18)$$

Dónde:

A = indicador de la calidad del alimento.

t = tiempo.

k_A = constante de velocidad específica para la variación de A .

n = orden de reacción ($n \geq 0$).

El signo de la ecuación está asociado con la disminución de la calidad del alimento; es decir, será negativo cuando la calidad del alimento y el indicador (A) disminuyen y positivo cuando la calidad disminuye con el aumento del indicador (por ejemplo, como ocurre con la cantidad de microorganismos indeseables en el alimento). Por lo tanto, de acuerdo con el orden de la reacción del deterioro, la ecuación se transforma como se especifica en la Tabla 1-6.

Tabla 1-6. Ecuaciones de cinética de acuerdo con el orden de la reacción de deterioro

Orden de reacción	Ecuación de velocidad	Ecuación integrada	Ejemplos
n = 0	$-\frac{dA}{dt} = k_A$	$A_{lim} = A_0 - k_A t$	Pardeamiento no enzimático, deterioro de alimentos congelados, deterioro químico.
n = 1	$-\frac{dA}{dt} = k_A[A]$	$\ln(A_{lim}) = \ln(A_0) - k_A t$	Oxidación lipídica, crecimiento de microorganismos, pérdida de vitaminas y de textura, deterioro químico
n = 2	$-\frac{dA}{dt} = k_A[A]^2$	$\frac{1}{A_{lim}} = \frac{1}{A_0} + k_A t$	Poco comunes
n = n	$-\frac{dA}{dt} = k_A[A]^n$	$\left(\frac{1}{A_{lim}}\right)^{n-1} = \left(\frac{1}{A_0}\right)^{n-1} + (n-1)k_A t$	----

Fuente: (Taoukis et al., 1997; Mizrahi, 2000, 2011; Kong and Singh, 2011; Sousa and Mahajan, 2011; Salas, 2015).

Dónde:

A_{lim} = valor límite (mínimo o máximo) para el indicador de calidad donde es intolerable para la aceptación del alimento.

A_0 = valor inicial para el indicador de calidad cuando $t = 0$.

k_A = constante de velocidad específica para la variación de A.

t = tiempo.

Con el fin de establecer el orden de la reacción, se necesitan datos experimentales del indicador de calidad que permitan verificar la linealidad de la ecuación, y a su vez encontrar la constante de velocidad específica (como la pendiente de la recta). De acuerdo con la complejidad del sistema, determinado por las variables que intervienen en el proceso de degradación del alimento y la interacción entre las mismas, es necesario implementar modelos de análisis multivariado, ecuaciones polinomiales o modelos no lineales (Corradini and Peleg, 2007; Dominguez and Mario, 2011; Salas, 2015; Derossi et al., 2016).

Además de las características propias del alimento (humedad, pH, actividad de agua, macronutrientes, etc.) la vida útil depende de parámetros extrínsecos (temperatura de almacenamiento, humedad relativa, material empaque, uso de atmósferas modificadas y aditivos). Dentro de los parámetros extrínsecos, la temperatura de almacenamiento es el parámetro de mayor relevancia en los estudios de estabilidad, ya que parece ser un factor clave que influye en el deterioro de los alimentos (Nychas *et al.*, 2008).

El modelo de Arrhenius, que relaciona la velocidad de una reacción química con los cambios de la temperatura, es el más empleado para la descripción de las reacciones de deterioro de un alimento en función de la temperatura (Kilcast and Subramaniam, 2000b; Kong and Singh, 2011):

$$k = k_0 \exp\left(-\frac{E_A}{RT}\right) \quad (1.19)$$

$$\ln(k) = \ln(k_0) - \left(\frac{E_A}{RT}\right) \quad (1.20)$$

Dónde:

k = constante de velocidad.

k_0 = constante de Arrhenius.

E_A = energía de activación.

R = constante de los gases (8,314 J.mol⁻¹.K⁻¹) .

T = temperatura absoluta.

Por lo tanto, al contar con valores de la constante de velocidad a diferentes temperaturas y si al graficarlos su tendencia es una línea recta, podrán encontrarse los valores para la constante de Arrhenius y la energía de activación. En algunos casos el efecto de la temperatura sobre la cinética de las reacciones de deterioro del alimento no sigue el comportamiento modelado por Arrhenius. En estos casos se consideran: (1) desarrollo de reacciones paralelas, (2) cambios de fase en rangos cercanos a las temperaturas de transición vítrea de algunos carbohidratos o de desnaturalización de las proteínas, (3) procesos de fusión/congelación del agua que modifican la actividad de agua (4) cambios de pH, entre otros (Kong and Singh, 2011; Mizrahi, 2011; Valero *et al.*, 2012).

Con esta información, puede estimarse cómo el cambio de temperatura puede afectar la velocidad de reacción. Para simplificar el proceso, se define el Q_{10} , como la relación de dos velocidades de deterioro con una diferencia de temperaturas de 10°C. El valor de Q_{10}

puede ser calculado utilizando la ecuación de Arrhenius para expresar la velocidad de reacción primero para una temperatura de (T+10) y luego para T (Mizrahi, 2000; Sousa and Mahajan, 2011; Salas, 2015; Marques *et al.*, 2018):

$$\ln(Q_{10}) = \left(-\frac{EA}{R}\right) \left(\frac{1}{(T+10)} - \frac{1}{T}\right) = \left(\frac{EA}{R}\right) \left(\frac{10}{T(T+10)}\right) Q_{10} = \frac{k_0 \exp\left(-\frac{EA}{R(T+10)}\right)}{k_0 \exp\left(-\frac{EA}{RT}\right)} \quad (1.21)$$

$$Q_{10} = \frac{\text{Tiempo de vida útil a } T}{\text{Tiempo de vida útil a } (T+10)} = \frac{k|_{T+10}}{k|_T} \quad (1.22)$$

1.2.1 Estimación de vida útil por deterioro sensorial

En muchos alimentos los cambios más importantes que afectan su calidad están en sus características organolépticas, razón por la cual se realiza la estimación de la vida útil por medio de técnicas de análisis sensorial. Debido a la necesidad de medir la respuesta sensorial en seres humanos como instrumento de calidad de los alimentos, deben considerarse factores como la exactitud, la precisión y la validez. Para el empleo de pruebas de análisis sensorial es necesario establecer requerimientos como (Kilcast, 2000; Hough, 2010; Giménez *et al.*, 2012):

- Establecimiento claro del objetivo del sistema de evaluación sensorial.
- Empleo de un espacio específico para el análisis sensorial.
- Selección de los procedimientos (técnicas de análisis) adecuados para el objetivo establecido.
- Selección y entrenamiento de panelistas.
- Manejo y análisis de datos.

La elección de las pruebas de análisis sensorial para la evaluación de vida útil depende del objetivo del análisis y de la interpretación de los resultados en relación con la calidad del alimento. Las pruebas discriminativas se emplean si el criterio de vida útil se define en términos de la detección de un cambio en el producto. Generalmente se detectan pequeños cambios que son irrelevantes en relación con la vida útil, por lo que la mayoría de las pruebas sensoriales emplean medidas cuantitativas del cambio que resultan abiertas a la interpretación en relación con el consumo del producto. También es posible utilizar pruebas hedónicas para evaluar la aceptabilidad del consumidor de forma directa.

Sin embargo, debido a su costo, generalmente se emplean pruebas cuantitativas con panel entrenado para establecer los puntos críticos de variación y evaluar el impacto de los cambios en la aceptabilidad (Kilcast, 2000).

Sin importar la metodología de análisis seleccionada, la determinación de la vida útil de un producto en relación con sus características sensoriales requiere la selección de criterios de falla o de un punto de corte, que corresponde con el deterioro máximo que se considera aceptable para el consumo del alimento (Kilcast, 2000; Giménez *et al.*, 2012).

Se emplean criterios de falla al considerar respuestas sensoriales: (1) aumento o disminución en la intensidad media de un atributo sensorial, (2) período de conservación (tiempo para alcanzar una calidad general no deseada), (3) establecimiento de una diferencia perceptible en relación con el producto fresco, (4) diferencias significativas en el perfil descriptivo del producto fresco, (5) puntuación de los consumidores para elegir o comprar el producto, (6) la correlación entre los datos analíticos y afectivos y (7) el establecimiento de un tiempo de falla. Cabe destacar que las metodologías más empleadas son (Kilcast, 2000; Giménez *et al.*, 2012):

- Métodos basados en la calidad: se realiza una estimación de la calidad del alimento empleando un panel de evaluadores entrenados o un grupo de expertos considerando (1) diferencia global con respecto a la muestra fresca, (2) calidad en general y (3) atributos de intensidad.
- Métodos de límites de aceptabilidad: se aplica teniendo en cuenta la interacción entre el alimento y el consumidor, mediante el empleo de escalas hedónicas en las que el consumidor establece si el producto presenta una calidad menor de la esperada. Para aceptar el producto es necesario un juicio integral de las características sensoriales percibidas. Por lo tanto, se establece el periodo de vida útil como el tiempo de almacenamiento en el que se detecta el primer cambio significativo en la aceptabilidad general en relación con el producto fresco. El límite de aceptabilidad se calcula como la primera puntuación global que es significativamente diferente de la muestra fresca.
- Metodología de punto de corte: se evalúa el comportamiento del atributo del alimento que se relaciona como indicador de calidad con el tiempo de almacenamiento. Teniendo en cuenta que existe un valor límite a partir del cual el

consumidor rechaza el producto, se establece el punto de corte de estas curvas con el fin de determinar el tiempo de vida útil, tal como se ilustra en la Figura 1.4.

- **Análisis de supervivencia:** es un conjunto de procedimientos estadísticos que se aplican hasta que un evento de interés se produce. Se utiliza ampliamente en estudios clínicos (epidemiología, biología, sociología y estudios de confiabilidad). Cuando se aplica a estimaciones de vida útil sensoriales esta metodología se centra en el riesgo de rechazo del producto por parte de los consumidores a causa de su deterioro.

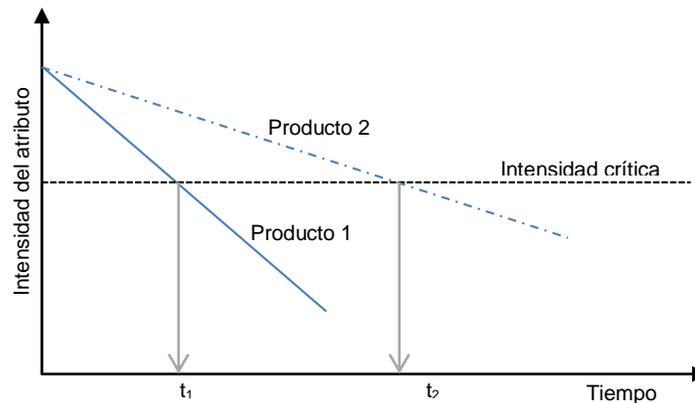


Figura 1.4: Establecimiento del tiempo de vida útil mediante de punto de corte.

Fuente: Adaptado de (Kilcast, 2000) con el permiso de Elsevier.

1.2.2 Estimación de vida útil por deterioro microbiológico

En el caso específico de frutas y verduras la microbiota es muy variable y compleja, ya que sufren diferentes tipos de contaminación durante el procesamiento y almacenamiento. En alimentos procesados, la actividad microbiana aumenta como consecuencia del aumento de la superficie de contacto, pérdida de la integridad celular y daños mecánicos. En estos casos es necesario evaluar si los niveles de población alcanzados de un microorganismo o conjunto de microorganismos en particular son capaces de producir factores alterantes asociados con el deterioro o el rechazo sensorial por parte de los consumidores. Los microorganismos más importantes que causan el deterioro de productos hortofrutícolas después de la cosecha son los hongos. Estudios en diferentes grupos de alimentos han establecido criterios de calidad, que se muestran en la Tabla 1-7, para el caso de productos de origen vegetal (Kilcast and Subramaniam, 2000b; Pinheiro *et al.*, 2005; Morgado *et al.*, 2018).

Tabla 1-7. Criterios de calidad microbiológica (UFC/g) en productos hortofrutícolas procesados.

Microorganismo	Índices de calidad microbiológica (UFC/g)		
	Satisfactorio	Aceptable	Insatisfactorio
Mesófilos aerobios	$\leq 10^4$	$>10^4 \leq 10^6$	$>10^6$
Levaduras	$\leq 10^2$	$>10^2 \leq 10^5$	$>10^5$
Mohos	$\leq 10^2$	$>10^2 \leq 10^3$	$>10^3$
Coliformes totales	$\leq 10^2$	$>10^2 \leq 10^4$	$>10^4$
<i>E. coli</i>	≤ 10	$>10 \leq 10^2$	$\geq 10^2$

Fuente: Adaptado de (Santos *et al.*, 2005).

De manera análoga al desarrollo de modelos matemáticos que predicen el deterioro fisicoquímico que pueda sufrir un alimento, se han desarrollado modelos que permiten estimar la vida útil de los alimentos a partir de parámetros microbiológicos. Los modelos polinomiales describen las respuestas de crecimiento ($\mu_{m\acute{a}x}$, tiempo de fase *lag*) a través de una función polinómica. Las desventajas de estos radican en la gran cantidad de parámetros y su falta de significancia biológica (Valero *et al.*, 2012).

Entre los modelos no lineales, el modelo modificado de Gompertz se ha aplicado con éxito para describir las diferentes fases de crecimiento microbiano. Una de las formas modificadas que facilitan la parametrización y el ajuste del modelo que tradicionalmente se usan en estudios de vida útil se muestra en la ecuación (1.23) (Valero *et al.*, 2012; Wang, 2018).

$$\text{Log } N_t = \text{log } N_0 * \text{log} \left(\frac{N_{m\acute{a}x}}{N_0} \right) * \exp \left\{ - \exp \left[\frac{\mu_{m\acute{a}x} * 2,7182}{\text{log} \left(\frac{N_{m\acute{a}x}}{N_0} \right)} * (t_{lag} - t) + 1 \right] \right\} \quad (1.23)$$

Dónde:

N_t = población microbiana en UFC.g⁻¹ a determinado tiempo *t*.

N_0 = población microbiana inicial en UFC.g⁻¹

$N_{m\acute{a}x}$ = población microbiana máxima en UFC.g⁻¹

t_{lag} = tiempo de la fase de adaptación en días

$\mu_{m\acute{a}x}$ = velocidad de crecimiento específica máxima.

Los principales factores que influyen en la estabilidad microbiana en los alimentos son la temperatura, pH y actividad de agua. La temperatura en particular puede variar significativamente, siendo un parámetro de alto impacto sobre la velocidad de

crecimiento específico y la fase de latencia de los microorganismos. Para el modelamiento se emplea la ecuación de Arrhenius (Taoukis *et al.*, 1997; Geeraerd *et al.*, 1998).

Como resumen del capítulo puede decirse que:

A pesar de que la fermentación láctica es un proceso empleado desde hace mucho tiempo para la transformación y conservación de diversos alimentos, también ha evolucionado gracias a diversos estudios científicos.

De acuerdo con los microorganismos empleados, la fermentación láctica modifica características sensoriales del alimento y puede proporcionarle propiedades funcionales, además de contribuir a su conservación. Las bacterias lácticas empleadas para este proceso tienen requerimientos específicos para su supervivencia. Su metabolismo se ve influenciado por las condiciones del medio (por ejemplo: micronutrientes, fuentes de carbono, nitrógeno, pH, temperatura) y por la presencia de otros microorganismos. En correspondencia con lo anterior, las características del alimento fermentado dependen de los microorganismos que intervienen en el proceso y de las condiciones del mismo.

El consumo de algunos alimentos de origen vegetal conservados mediante fermentación láctica, forma parte de las tradiciones en diferentes culturas y su estudio ha permitido entender los diferentes fenómenos que intervienen en su proceso de obtención. Cuando se emplean microorganismos probióticos en la fermentación de alimentos de origen vegetal, pueden tenerse beneficios en la salud de los consumidores sin las desventajas que tienen algunos productos lácteos y cárnicos como el contenido de lactosa y/o colesterol. Por lo tanto, puede suponerse que la combinación entre las tradiciones de diversas culturas y algunos estudios científicos puede favorecer el desarrollo de una comunidad.

Las frutas y las hortalizas son reconocidas por su actividad antioxidante, la cual puede verse afectada o favorecida por su procesamiento. La valoración de la influencia de la fermentación puede realizarse empleando diferentes técnicas analíticas que permiten estimar la actividad del alimento frente a diferentes radicales.

El modelamiento de los procesos fermentativos es un área de estudios compleja debido a que involucra múltiples fenómenos. Puede abordarse considerando los cambios en el

sustrato y/o los cambios en la célula. Por lo tanto, entre más simple es el sustrato empleado para la fermentación, más sencillo es su modelamiento. Esto hace que el ajuste de modelos a fermentaciones de alimentos se dificulte.

Son muchos los cambios que se producen en el alimento durante su periodo de almacenamiento. Dependen de las características del alimento y de su entorno. El tiempo de vida útil del alimento está determinado por la velocidad en la que ocurren dichos cambios y que afectan la calidad del alimento y/o las expectativas del consumidor. Por lo tanto, el modelamiento de estos cambios podría predecir el tiempo de vida útil del alimento.

2. Planteamiento del problema

Colombia tiene potencial para la producción de una amplia variedad de frutas y de hortalizas, a lo largo de todo el año. Por otra parte, el desarrollo de la industria procesadora de frutas y hortalizas ha sido lento y aislado en algunos segmentos de la producción. Teniendo en cuenta que el desarrollo competitivo del sector hortofrutícola colombiano está íntimamente relacionado con la capacidad de procesamiento industrial y de generar valor agregado, ganan importancia los esfuerzos científicos que permitan reducir la brecha tecnológica existente y así ampliar los mercados y aprovechar las nuevas oportunidades comerciales.

La fermentación láctica es un proceso que agrega valor a los alimentos y favorece su conservación. Se emplea frecuentemente en alimentos susceptibles al deterioro por tener un pH cercano a la neutralidad (lácteos y cárnicos). A pesar las múltiples aplicaciones en alimentos de origen vegetal, en Colombia su consumo es poco frecuente, posiblemente debido a sus propiedades sensoriales. Adicionalmente, algunos desarrollos alcanzados en este campo no se encuentran disponibles para la implementación a corto plazo.

Por consiguiente, se plantea la posibilidad de realizar la fermentación láctica en frutas y vegetales de consumo habitual en Colombia, empleando cepas altamente disponibles, de uso frecuente y de fácil utilización, como las usadas industrialmente para la obtención del yogurt. La principal dificultad de este proceso se centra en que estos cultivos han sido diseñados para funcionar en un sustrato de características significativamente diferentes lo que hace que su supervivencia y crecimiento se dificulte. La mezcla entre una fruta y un vegetal permitió contar con un sustrato de condiciones adecuadas para el crecimiento de estas bacterias. Se esperaba que bajo estas condiciones el producto fermentado tuviera características sensoriales que favorezcan su aceptación.

La aplicación de métodos científicos para la realización de estudios de vida útil de los alimentos obtenidos permite mejorar los requerimientos de almacenamiento y predecir el

comportamiento del producto en diferentes condiciones, en especial las relacionadas con la temperatura.

Por lo tanto, se plantean las siguientes preguntas de investigación:

¿Qué procesos de transformación se requieren para aplicar la fermentación láctica en matrices vegetales con el fin de obtener un alimento con características funcionales?

¿Qué efecto tendrá la fermentación láctica sobre las propiedades fisicoquímicas, microbiológicas y sensoriales de las matrices vegetales empleadas?

Hipótesis:

El diseño de procesos de transformación de productos hortofrutícolas colombianos que faciliten la aplicación de la fermentación láctica en matrices vegetales permitirá obtener un alimento con características funcionales y un mayor tiempo de vida útil.

2.1 Objetivo general

Establecer las condiciones de proceso para la obtención de productos elaborados a base de frutas y hortalizas mediante la aplicación de fermentación láctica como alternativa para la generación de valor.

2.2 Objetivos específicos

1. Establecer y aplicar criterios que permitan seleccionar las frutas, las hortalizas y las mezclas de los mismos, que tengan potencial para la aplicación de la fermentación láctica.
2. Establecer el procedimiento para aplicar la fermentación láctica en las matrices vegetales seleccionadas.
3. Evaluar el efecto de la fermentación láctica en las matrices vegetales sobre sus propiedades fisicoquímicas, funcionales y sensoriales.
4. Establecer modelos que permitan predecir el tiempo de vida útil de los productos diseñados.

2.3 Estrategia general

Como estrategia general para esta investigación se planteó una metodología que divide el proyecto en etapas que corresponden con los objetivos específicos propuestos. Se presenta un esquema de esta estrategia en la Figura 2-1.

De esta manera, para el cumplimiento del primer objetivo se realizaron dos procesos diferentes de selección. El primero fundamentado en pautas comerciales y productivas, a partir de una revisión bibliográfica, permitió identificar ocho frutas y cinco hortalizas para continuar la investigación.

Se reconoció la necesidad de realizar mezclas de una fruta y una hortaliza para mejorar la aceptabilidad y viabilidad de las bacterias lácticas, teniendo en cuenta que: (1) en Colombia las frutas son más aceptadas que las hortalizas y (2) las propiedades fisicoquímicas de las hortalizas pueden favorecer el crecimiento de las bacterias lácticas. Por lo tanto, se obtuvieron mezclas de pulpas de las frutas y hortalizas seleccionadas previamente. El segundo proceso de selección consideró las características fisicoquímicas de estas mezclas como un criterio técnico relacionado con la viabilidad de las bacterias lácticas. Se seleccionaron variables fisicoquímicas sencillas de valorar porque con las que están más disponibles para los productores de frutas y hortalizas.

Para el segundo objetivo se evaluaron procedimientos previos a la fermentación con el fin de favorecer la adaptación de las bacterias lácticas a los diferentes sustratos.. Se consideraron dos procesos: neutralización y acondicionamiento del cultivo. Con los resultados de esta evaluación se realizó el estudio de la fermentación de las mezclas y los efectos que produce la variación del cultivo empleado. Se seleccionaron cultivos para la obtención de yogurt ya que son los más disponibles y fáciles de adquirir por los productores de frutas.

Finalmente, para el tercer y el cuarto objetivos, se realizó el estudio cinético y de vida útil mediante el seguimiento de características fisicoquímicas y microbiológicas con el fin de para evaluar los cambios producidos durante la fermentación y el almacenamiento de una mezcla fermentada.

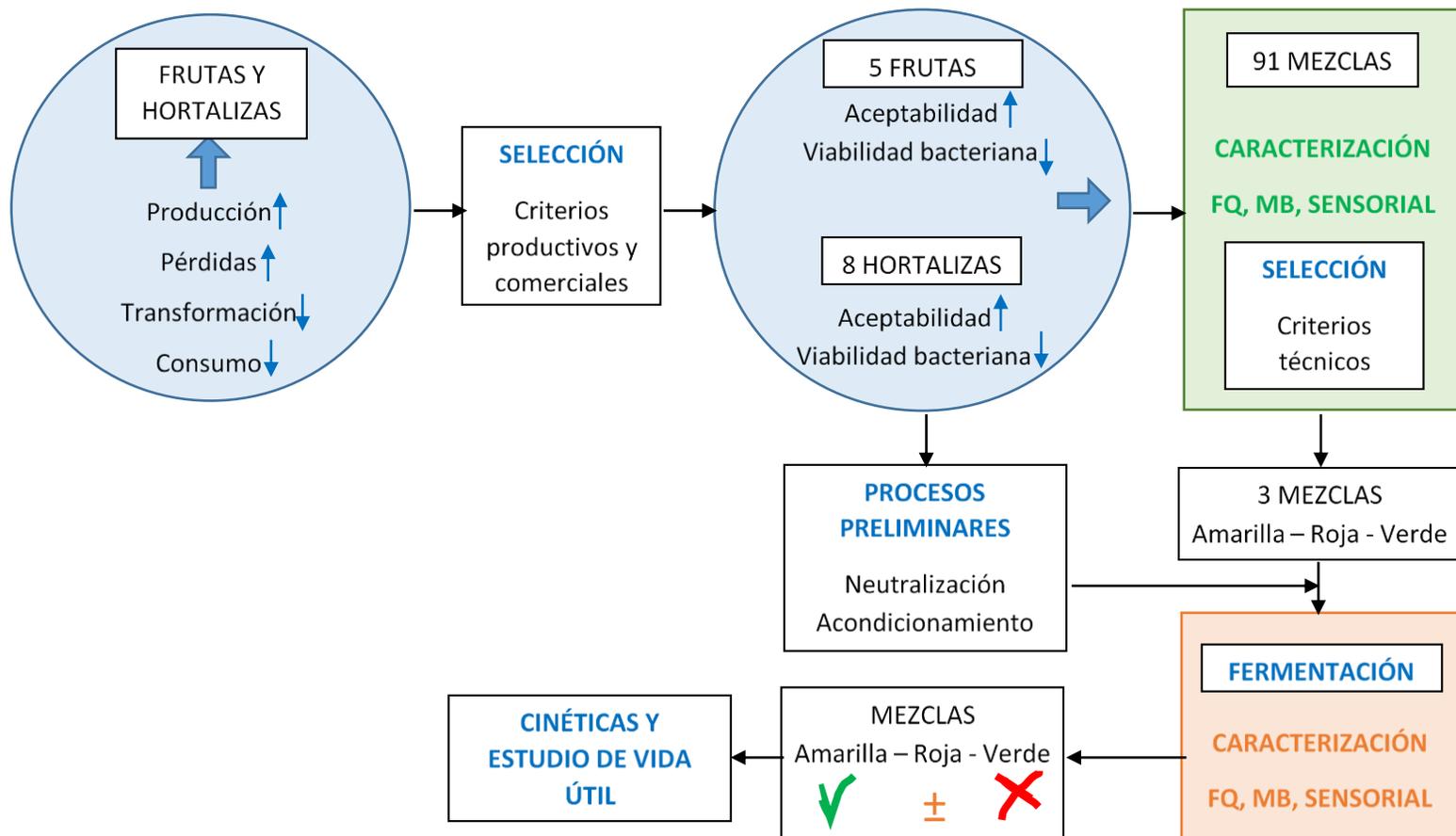


Figura 2-1. Esquema de la estrategia general para el proyecto

3. Materiales y métodos

3.1 Materiales

3.1.1 Obtención de pulpas de frutas y hortalizas

Se adquirieron frutas y hortalizas frescas en un mercado local (Chía, Cundinamarca, Colombia), garantizando que fueran siempre de la misma especie. Se emplearon: uchuva (*Physalis peruviana*), maracuyá (*Passiflora edulis*), mango (*Mangifera indica*), fresa (*Fragaria chiloensis*), mora (*Rubus glaucus*), guayaba (*Psidium guajava*), feijoa (*Acca sellowiana*), lulo (*Solanum quitoense*), zanahoria (*Daucus carota*), ahuyama (*Cucurbita maxima*), remolacha (*Beta vulgaris*), espinaca (*Spinacia oleracea*) y guatila (*Sechium edule*).

En cuanto a las características de calidad, se emplearon frutas que cumplieran con todos los requisitos de calidad generales descritos detalladamente en las normas técnicas colombianas vigentes (ver Tabla 3-1 y ANEXO H).

Tabla 3-1. Características de calidad de las frutas seleccionadas de acuerdo con la normatividad colombiana vigente.

Fruta	Norma técnica	Tolerancia de calidad	Requisitos de madurez específicos		
			Color (NTC)	Grados Brix	Acidez (% Ác. cítrico)
Mora	NTC 4106 (1997)	Hasta categoría III	4 - 6	6.7 - 8.5	2.5 – 3.1(Ác. málico)
Fresa	NTC 4103 (1997)	Hasta categoría III	4 - 6	6.9 - 8.5	0.78 - 0.93
Guayaba	NTC 1263 (1970)	Hasta 2ª calidad	No considerados en la norma		
Mango	NTC 5139 (2002)	Hasta categoría II	3 - 5	14.9 – 16.4	0.41 - 0.61
	NTC 5210 (2003)	Hasta categoría II	2 -4	8.5 – 12.4	0.51 - 0.83
Uchuva	NTC 4580 (1999)	Hasta categoría II	4 – 6	14.5 - 15.1	1.68 - 2.03
Maracuyá	NTC 1267 (1979)	Hasta 2ª calidad	No considerados en la norma		
Lulo	NTC 5093 (2002)	Hasta categoría II	3 - 5	8.6 - 10.1	Max. 3.23
Remolacha	NTC 1224 (1979)	Hasta 2ª calidad	No considerados en la norma		
Zanahoria	NTC 1226 (1994)	Hasta 2ª calidad	No considerados en la norma		
Espinaca	NTC 1373 (1978)	Hasta 2ª calidad	No considerados en la norma		

3.1.2 Estudio de la fermentación láctica

- Sustratos

Para el estudio de la fermentación láctica se emplearon pulpas de frutas (mango, guayaba y feijoa), hortalizas (ahuyama, remolacha y espinaca) y mezclas (amarilla, roja y verde) obtenidas mediante los procedimientos 3.3.1 y 3.3.2. La caracterización de estos sustratos se presenta como parte de los resultados del capítulo 5.

- Cultivos lácticos

Se emplearon cultivos mixtos y simples comercializados por Danisco (Danisco, Dinamarca), recomendados para la producción de bebidas lácteas fermentadas por inoculación directa con la siguiente composición:

Cultivo mixto 1:	<i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Lactobacillus delbrueckii subps. lactis</i> <i>Lactobacillus delbrueckii subps. bulgaricus.</i>
Cultivo mixto 2:	<i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Lactobacillus delbrueckii subps. bulgaricus</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Bifidobacterium lactis.</i>
Cultivo simple 1:	<i>Lactobacillus acidophilus.</i>
Cultivo simple 2:	<i>Bifidobacterium lactis.</i>

- Bebidas prebióticas

Para realizar el acondicionamiento de los cultivos se emplearon bebidas prebióticas para promover el mantenimiento y crecimiento de los cultivos. La bebida de soya se produjo aplicando el proceso obtenido por (Becerra and Leguía, 2000). Para la bebida de avena se empleó avena molida comercial disuelta en agua potable (10% p/v).

3.1.3 Estudio de vida útil

Para la realización del estudio de vida útil se empleó la mezcla amarilla (mango 80% y ahuyama 20% p/p). Para la obtención de la mezcla fermentada se empleó el cultivo mixto 1 y el procedimiento detallado en el apartado 3.3.3.

3.2 Métodos

3.2.1 Caracterización fisicoquímica y microbiológica de pulpas y mezclas

Se realizaron mediciones de las propiedades microbiológicas y fisicoquímicas empleando procedimientos estandarizados de acuerdo con la Tabla 3-2 y la Tabla 3-3, respectivamente.

Tabla 3-2 Técnicas analíticas para la caracterización microbiológica de pulpas

Parámetros microbiológicos ¹	Procedimiento implementado
Recuento de mesófilos (UFC/g o mL)	Manual de Técnicas de Análisis para Control de Calidad Microbiológico de Alimentos para consumo humano del Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos – INVIMA, 1998
NMP. de coliformes totales	
Recuento <i>E. coli</i> (UFC/g o mL)	
Recuento de esporas <i>Clostridium</i> sulfito reductor	
Recuento de mohos y levaduras (UFC/g o mL)	

Tabla 3-3 Técnicas analíticas a emplear para la caracterización fisicoquímica de pulpas de frutas y hortalizas

Propiedad	Método	Procedimientos de referencia	Equipos empleados
Humedad	Secado en estufa	AOAC 920.149 (2005); AOAC 945.68 (2005)	Balanza analítica Estufa eléctrica regulada Desecador
Sólidos solubles	Refractometría	AOAC 932.12; NTC 4624; ISO 2173:2003	Refractómetro
pH	Potenciometría	NTC 4592; ISO 1842:1991	Potenciómetro
Acidez titulable	Titulación potenciométrica	AOAC 942.15; NTC 4623; ISO 6632:1981	Potenciómetro Balanza analítica
Color	Colorimetría por reflectancia	NTC 5622; ISO 11664-1:2007; ISO 11664-4:2008; ISO 11664-5:2009	Colorímetro

La determinación de crecimiento de bacterias lácticas se efectuó por duplicado, por conteo en placa en medio MRS (*Man, Rogosa y Sharpe*) de acuerdo a lo establecido en la norma ISO 27205:2010 (ISO, 2010) inoculando las ocho primeras diluciones. Los resultados se expresan en UFC/g de pulpa.

¹ NMP: Número más probable. UFC: Unidades formadoras de colonias

La determinación de mohos y levaduras se efectuó a $25.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$ siguiendo las directrices dadas en la NTC 4132 (ICONTEC, 1997) inoculando 1 mL de las tres primeras diluciones en cajas de Petri estériles con agar OGYE suplementado con oxitetraciclina. Se realizó conteo a los 3 - 5 días cuando el número de colonias en la caja estaba entre 30 y 300. Los resultados se expresan en UFC/ g de pulpa.

- Cálculos a partir de la determinación del color

El color de las muestras se midió empleando un espectrofotómetro CM-5 (Konica Minolta, Japón) con una fuente de luz D65 y observador de 10° como referencia. La determinación se realizó por duplicado y los resultados fueron reportados en la escala de color CIELab (L^* , a^* , b^*).

Se calculó la diferencia de color entre pulpas considerando el espacio de color CIELab donde la coordenada L (luminosidad) es un indicador de la claridad y la oscuridad del color, la coordenada a identifica la tonalidad desde el verde hacia el rojo y la coordenada b identifica la tonalidad desde el azul hacia el amarillo. La diferencia absoluta de color entre las muestras se calculó mediante la Ecuación (3.1), tomando como referencia o patrón la pulpa de fruta o la pulpa de hortaliza sin mezclar. Se transformaron las coordenadas a^* y b^* en coordenadas radiales C^* (*chroma*) y h (*hue*) mediante las ecuaciones (3.2) y (3.3), con el fin de evaluar los atributos del color y los cambios de tonalidad y de cromaticidad (MacDougall, 2002; Sant'Anna *et al.*, 2013).

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2)} = \sqrt{((L_t - L_0)^2 + (a_t - a_0)^2 + (b_t - b_0)^2)} \quad (3.1)$$

Dónde:

ΔE : Diferencia de color entre las diferentes muestras.

(L_0 , a_0 , b_0): Coordenadas colorimétricas para el patrón o referencia (o medidas en el tiempo $t = 0\text{h}$).

(L_t , a_t , b_t): Coordenadas colorimétricas para la muestra (o medidas en el tiempo $t = 3\text{h}$.)

$$C^* = \sqrt{a^2 + b^2} \quad (3.2)$$

$$h = \arctan\left(\frac{b}{a}\right) \quad (3.3)$$

3.2.2 Caracterización de carbohidratos y ácidos orgánicos

Se realizó la determinación del contenido de carbohidratos y ácidos orgánicos de las pulpas empleando cromatografía líquida de alta eficiencia (*HPLC*). El análisis se realizó en dos ocasiones. La primera para la caracterización de las pulpas y la segunda para el seguimiento de la fermentación.

- Caracterización de pulpas de frutas, hortalizas y mezclas

La muestra se preparó pesando 2.5 g de pulpa, que se disolvió en agua grado HPLC completando un volumen total de 100 mL. Posteriormente, se centrifugó a 4500 rpm por 10 minutos. Del sobrenadante se tomó una muestra de alrededor de 2mL, se filtró por una membrana de nylon de 0.2 μm y esta solución se inyectó en un cromatógrafo Jasco, de acuerdo con las condiciones detalladas en la Tabla 3-4 (Andersson and Hedlund, 1983; ISO 10504:1988, 1988; AOAC, 2005; Magwaza and Opara, 2015).

Tabla 3-4 Condiciones empleadas para la determinación de carbohidratos y ácidos orgánicos por HPLC

Condición	Carbohidratos	Ácidos orgánicos
Columna	Rezex RCM – Monosaccharide Ca ⁺² 300 x 7.8 mm	Rezex ROA-Organic Acid 300 x 7.8 mm
Temperatura	80°C (Jasco, CO-2065 Plus)	40°C (Jasco, CO-2065 Plus)
Detector	IR (Jasco, RI-2031 Plus) - 40°C	PDA (Jasco, PDA 2018 Plus) - 210 nm y 240 nm
Fase móvil	H ₂ O	5mM H ₂ SO ₄
Flujo	0.6 mL/min	0.6 mL/min
Volumen de inyección	20 μL	20 μL

- Seguimiento de la fermentación láctica

La muestra se preparó siguiendo el mismo procedimiento detallado anteriormente. Posteriormente se inyectó en un cromatógrafo Agilent, de acuerdo con las condiciones detalladas en la Tabla 3-5. Las rectas de calibración y los tiempos de retención obtenidos para estos análisis se presentan en el ANEXO B.

Tabla 3-5. Condiciones empleadas para la determinación de carbohidratos y ácidos orgánicos por HPLC

Condición	Carbohidratos	Ácidos orgánicos
Columnas conectadas en serie	Aminex HPX – 87P y Aminex HPX – 87C 300 x 7.8 mm	Aminex HPX – 87H 300 x 7.8 mm
Temperatura	80°C (Horno Waters)	60°C (Horno Waters)
Detector	IR (Waters 2414) – 35°C	PDA (PDA Waters) - 210 nm y 240 nm
Fase móvil	H ₂ O	5mM H ₂ SO ₄
Flujo	0.6 mL/min	0.8 mL/min
Volumen de inyección	100µL	100µL

3.2.3 Caracterización sensorial

Se realizaron dos tipos de pruebas: una enfocada hacia el consumidor (prueba hedónica) y otra enfocada hacia el producto (prueba descriptiva) (Ureña Peralta and D'Arrigo Huapaya, 1999).

Se realizó una prueba hedónica cuantitativa de la medida el grado de satisfacción. Considerando que aceptabilidad y preferencia son diferentes, se aplicó la prueba con el objetivo de identificar el grado de aceptación de las pulpas. Para ello se empleó una escala hedónica de tres puntos. La encuesta fue aplicada a una población de 90 personas seleccionadas de forma aleatoria en Bogotá D.C., en una proporción similar de hombres y mujeres con edad entre 18 y 65 años. La muestra codificada (número aleatorio de 3 dígitos) se presentó en vasitos plásticos inodoros con tapa, a una temperatura entre 4 y 8°C. Se asoció una escala cuantitativa a la escala cualitativa de tres puntos: Me gusta (3), Ni me gusta ni me disgusta (2), Me disgusta (1).

Las pruebas descriptivas se realizaron con el objetivo de definir las características sensoriales de la pulpa fermentada y las diferencias existentes con las pulpas sin fermentar. Se empleó el panel semi-entrenado con 12 jueces de la Universidad Politécnica de Cataluña. Las muestras fermentadas y sin fermentar se probaron en la misma sesión. Se valoraron 8 atributos (apariencia, consistencia, color, olor característico, sabor ácido, sabor dulce, sabor característico, textura). Para el entrenamiento se usaron muestras modelo (con adición de zumo de limón o de sacarosa y muestras comerciales de zumo, pudín o natilla) para establecer los valores extremos de la escala. La cuantificación se realizó empleando una escala no estructurada que

posteriormente se dividió en 10 puntos (1 punto = 1cm, para un máximo de 10cm). Los detalles de la evaluación se presentan en el ANEXO F.

3.2.4 Determinación de la capacidad antirradicalaria

Se prepararon extractos con solución acuosa de metanol al 80% v/v como disolvente. Las pulpas se disolvieron en una relación de 0.5 g de pulpa en 10mL de solvente, empleando un homogeneizador (UltraTurrax) durante 2 min. Los extractos se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 minutos.

- *Determinación de polifenoles totales (Método Folin-Ciocalteu)*

A 20µL del extracto se adicionaron 80µL del reactivo Folin & Ciocalteu y 80µL de solución de carbonato de sodio al 20%. Se dejó reaccionar 1 hora en la oscuridad y se determinó la absorbancia por espectrofotometría a una longitud de $\lambda = 765$ nm. Los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra fresca (mg GAE / g).

- *Determinación de la capacidad antioxidante equivalente de Trolox (Trolox equivalent antioxidant capacity - TEAC)*

Se obtuvo el radical catiónico mediante la mezcla de 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico (ABTS) (7 mM) y persulfato de potasio (24,24 mM). La absorbancia del radical ABTS se ajustó entre 0.9 y 1.0, empleando PBS 10 mM (pH = 7,4) incubado a 30°C. A 200µL de la solución anterior se le adicionaron 20µL del extracto, se midió la absorbancia por espectrofotometría a una longitud de onda de $\lambda = 734$ nm durante 15 minutos. Se tomó como punto final el minuto 10 ya que a partir de éste no se observó disminución en la lectura. Los resultados se expresaron en forma de porcentaje de inhibición según la ecuación (3.4):

$$\text{Inhibición} = \left(\left(\frac{\text{Abs}(\text{ABTS}^{*+}) - \text{Abs}(\text{Muestra})}{\text{Abs}(\text{ABTS}^{*+})} \right) - \left(\frac{\text{Abs}(\text{ABTS}^{*+}) - \text{Abs}(\text{Blanco})}{\text{Abs}(\text{ABTS}^{*+})} \right) \right) * 100 \quad (3.4)$$

Dónde:

Abs(ABTS^{*+}) = Absorbancia del radical (t = 0)

Abs(Muestra) = Absorbancia del radical + muestra (t = 10min)

Abs(Blanco) = Absorbancia del radical + blanco (t = 10min)

- *Determinación de la capacidad reductora del Fe(II) (Ferric Reducing Antioxidant Power - FRAP)*

El reactivo FRAP se preparó a partir de tampón acetato (300 mM) y los reactivos 2, 4, 6-Tripyridyl-s-Triazina (TPTZ) (10 mM) y cloruro de hierro (III) (20 mM). Estos se mezclaron en la relación 10:1:1 respectivamente. A 200µL de la solución anterior incubada a 37°C se le adicionaron 20µL del extracto. Se realizó la lectura de la absorbancia en el espectrofotómetro midiendo a una longitud de onda de $\lambda = 593$ nm después de 15 minutos de reacción. Los resultados se expresaron como equivalentes de 6-hidroxi-2, 5, 7, 8 - tetrametilcromo- 2-Ácido Carboxílico (Trolox) por gramo de muestra ($\mu\text{mol TE/ g}$).

- *Método DPPH*

A 200µL de una solución 2,2- difenil- 1-picrilhidracil (DPPH) (5.07 mM en metanol) se adicionaron 20µL de los extractos. Se midió la absorbancia mediante espectrofotometría a una $\lambda = 512$ nm durante 75 minutos. Se tomó como resultado final el minuto 75. Los resultados se expresaron como equivalentes de Trolox por gramo de muestra ($\mu\text{mol TE / g}$) en función del porcentaje de inhibición según la ecuación (3.5):

$$\text{Inhibición} = \left(\left(\frac{\text{Abs(DPPH)} - \text{Abs(Muestra)}}{\text{Abs(DPPH)}} \right) - \left(\frac{\text{Abs(DPPH)} - \text{Abs(Blanco)}}{\text{Abs(DPPH)}} \right) \right) * 100 \quad (3.5)$$

Dónde:

Abs(DPPH) = Absorbancia del DPPH (t=0)

Abs(Muestra) = Absorbancia del DPPH + muestra (t =75min)

Abs(Blanco) = Absorbancia del DPPH + blanco (t =75min)

- *Capacidad de absorbancia del radical de oxígeno (Oxygen Radical Absorbance Capacity - ORAC)*

A 40µL del extracto diluido (relación 1:10 v/v, en agua desionizada) se adicionaron 120µL de fluoresceína. Se realizó una lectura inicial de la absorbancia a 37 °C de temperatura. Posteriormente, se agregaron 40µL del 2,2,-Azobis(2-Metilpropinamida) (AAPH) (0.3 M) y se continuó con las medidas durante 2 horas. Los resultados se expresaron como equivalentes de Trolox por gramo de muestra ($\mu\text{mol TE / g}$) mediante la expresión (3.6):

$$\text{Disminución fluorescencia} = \text{AUC} - \text{AUCB} = [(0.5 + \sum_{i=0}^n (f_n / f_0)) * t_c] - \text{AUCB} \quad (3.6)$$

Dónde:

AUC = área bajo la curva de la muestra

AUCB = área bajo la curva del blanco

f_i = unidades de fluorescencia (f_0 , corresponde al valor de la primera lectura).

n = número de ciclos.

t_c = tiempo de cada ciclo, en este caso, 2 minutos.

3.3 Procedimientos experimentales

3.3.1 Obtención de pulpas de frutas y hortalizas

Se aplicaron las operaciones de adecuación (clasificación, lavado y desinfección), separación (pelado, cortado, molienda y despulpado) y conservación (escaldado, cocción y envasado). En la Figura 3.1 se detalla el proceso empleado.

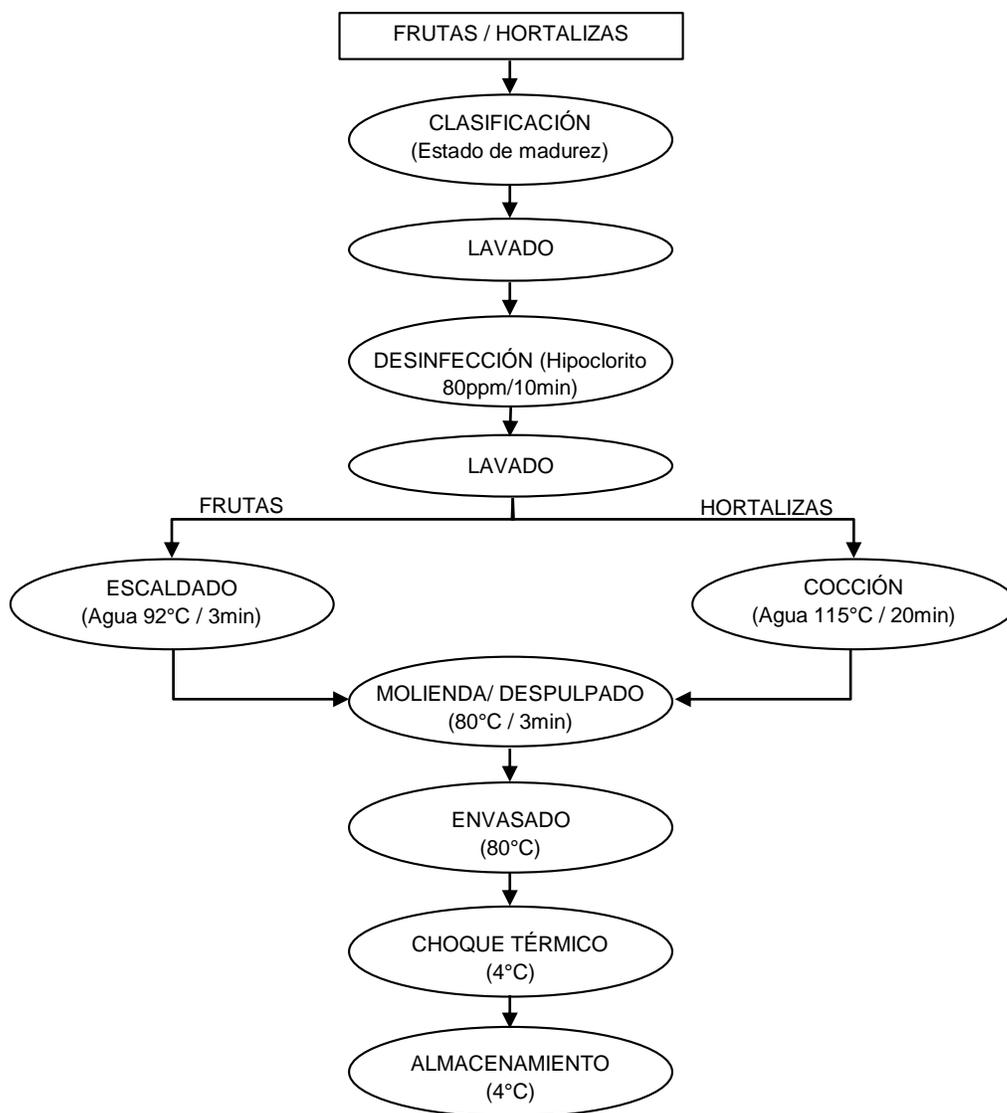


Figura 3.1: Proceso para la obtención de pulpa de frutas y hortalizas.

De acuerdo con la fruta y la hortaliza a utilizar se hicieron cambios en las operaciones y las condiciones empleadas. Por ejemplo:

- Adición de operaciones de adecuación para fresa, mora, feijoa, uchuva, remolacha y zanahoria (retirar el pedúnculo y el cáliz previo a la desinfección).
- Adición de operaciones de separación para mora, guayaba, uchuva, maracuyá, lulo (prensado y/o tamizado previo al envasado), mango y ahuyama (pelado, cortado y separación de la semilla previo a la molienda).
- Eliminación de la operación de cocción en la espinaca.

Todas las pulpas de frutas y de hortalizas se obtuvieron considerando los parámetros de la calidad mínimos y de obligatorio cumplimiento establecidos en la legislación colombiana y presentados en la Tabla 3-6 y Tabla 3-7 (MinSalud, 2013).

Tabla 3-6 Requisitos fisicoquímicos para las pulpas de frutas seleccionadas.

Fruta	Acidez titulable (% Ác. cítrico)	Grados Brix
Feijoa	1.60	9.0
Fresa	0.65	6.5
Guayaba	0.45	7.5
Lulo	1.0	6.0
Mango	0.3	12.5
Maracuyá	2.5	12.0
Mora	2.0	6.0
Uchuva	1.4	11.0

Fuente: (MinSalud, 2013)

Tabla 3-7 Requisitos microbiológicos de pulpas de frutas.

Producto	Requisitos	Parámetros			
		N	m	M	C
Pulpa sin tratamiento térmico	Recuento <i>Escherichia coli</i> (UFC/g o mL)	5	<10	-	0
	Recuento de mohos y levaduras (UFC/g o mL)	5	1000	3000	2
	Detección de <i>Salmonella</i> /25g	5	Ausencia	-	0
Pulpa pasteurizada	Recuento de mesófilos (UFC/g o mL)	5	1000	3000	1
	Recuento <i>Escherichia coli</i> (UFC/g o mL)	5	<10	-	0
	Recuento de mohos y levaduras (UFC/g o mL)	5	100	200	1

Fuente: (MinSalud, 2013)

Dónde: N: número de unidades a examinar.

m: Índice máximo permisible para identificar nivel de buena calidad.

M: Índice máximo permisible para identificar nivel de aceptable calidad.

C: Número máximo de muestras permisibles con resultados entre m y M.

3.3.2 Preparación de mezclas

A partir de las pulpas iniciales obtenidas de acuerdo con lo descrito en el apartado 3.3.1, se realizaron combinaciones de una fruta con una hortaliza en diferentes proporciones, teniendo como referencia cualitativa su color, por lo que se obtuvieron pulpas rojas, amarillas y verdes, tal como se presenta en la Tabla 3-8, con un total de 91 pulpas. Este proceso se realizó por duplicado.

Tabla 3-8 Esquema de ensayos experimentales para la obtención de mezclas de frutas y hortalizas

Proporción de pulpa (% (p/p))		Pulpas rojas	Pulpas amarillas	Pulpas verdes
Fruta	Hortaliza			
100	0		Mango – Ahuyama	
80	20		Uchuva – Ahuyama	Feijoa – Espinaca
60	40	Fresa – Remolacha	Maracuyá – Ahuyama	Lulo – Espinaca
50	50	Mora – Remolacha	Mango – Zanahoria	Feijoa – Guatila
40	60	Guayaba – Remolacha	Uchuva – Zanahoria	Lulo – Guatila
20	80		Maracuyá – Zanahoria	
0	100			

3.3.3 Operaciones previas a la fermentación

- *Neutralización de pulpas de frutas*

Como agente neutralizante se escogió hidróxido de sodio ya que: (1) es altamente soluble, (2) es una base fuerte que puede modificar fácilmente el pH usando pequeñas cantidades y (3) se emplea frecuentemente en la industria alimentaria (Vasiljevic *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2007, 2014; Abdel-Rahman *et al.*, 2011; Juturu and Wu, 2016). La neutralización se realizó mediante el siguiente procedimiento: A 30g de pulpa de fruta se adicionó 1mL de solución de NaOH 1N (4% p/v) hasta completar 6mL (como máximo). Luego de cada adición se midieron las variables de respuesta (pH y color). Se resalta que el pH se regula con el objetivo de evaluar la viabilidad de las bacterias lácticas a inocular, no para la obtención del alimento fermentado.

- *Acondicionamiento del cultivo*

Para el acondicionamiento se emplearon los materiales descritos en el apartado 3.1.2: bebidas de soya o avena y el cultivo mixto 1 en una dosis aproximada de 1×10^3 UFC/g en el sustrato.

El procedimiento empleado para el acondicionamiento del cultivo se ilustra en la Figura 3.2. Se realizó disolviendo el cultivo en una mezcla de pulpa (10% m/m) y agua, bebida de soya o avena (90% m/m) y manteniendo su temperatura a 42°C por 1 hora, con ayuda de un baño de agua. Posteriormente se mezcló este inóculo con el sustrato a fermentar, en una proporción de 10% (m/m).

El procedimiento empleado para los ensayos de fermentación sin acondicionamiento (adición directa), se presenta la Figura 3.3.

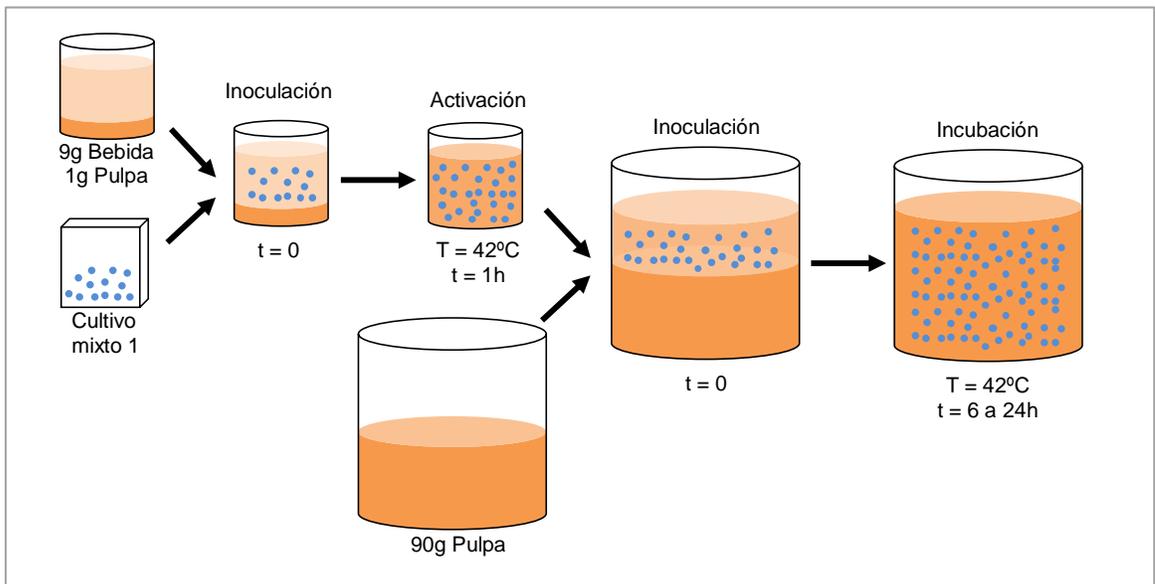


Figura 3.2: Esquema del acondicionamiento del cultivo.

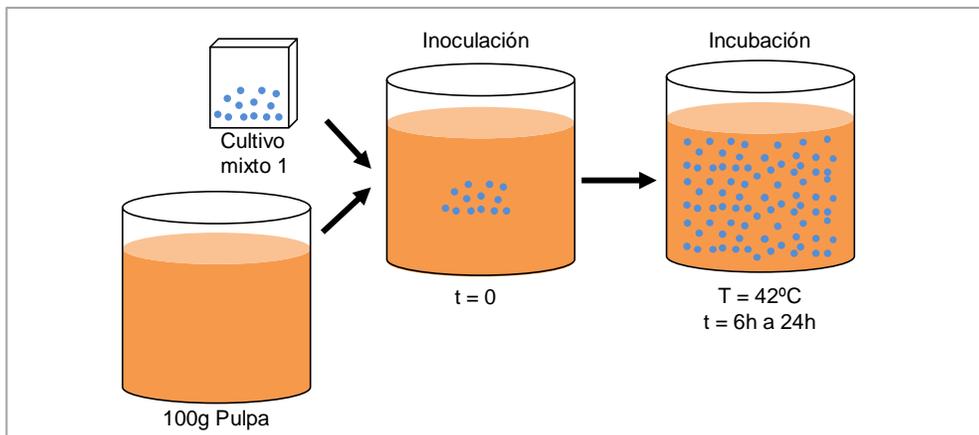


Figura 3.3: Esquema para la adición directa del cultivo (sin acondicionamiento).

3.3.4 Fermentación de pulpas

La fermentación de todos los sustratos se realizó siguiendo el procedimiento ilustrado en la Figura 3.4, partiendo de pulpas de frutas, hortalizas y mezclas obtenidas de acuerdo con los detalles especificados en los apartados 3.3.1 y 3.3.2. El tratamiento térmico se realizó en diferentes tiempos de acuerdo con la pulpa o mezcla a fermentar y su facilidad para la agitación.

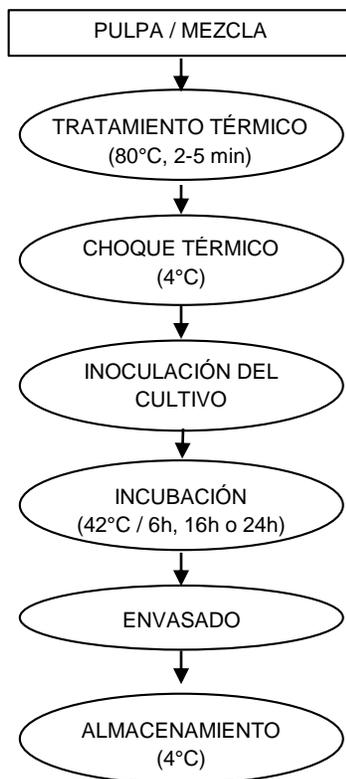


Figura 3.4: Proceso para la fermentación de pulpas de frutas, hortalizas y mezclas.

3.3.5 Estudio de vida útil

Las mezclas sin fermentar y fermentada (empleando el cultivo mixto 1, inoculación aproximada de 1×10^3 UFC/g, 24 horas, 42°C) fueron almacenadas en porciones de 100g en recipientes de polietileno de alta densidad con tapa hermética en diferentes temperaturas (5°C para las dos mezclas, 15°C y 25°C, para la mezcla fermentada), protegidas de la luz y sin control de la humedad relativa ambiental (80% en promedio).

3.4 Análisis estadístico

3.4.1 Caracterizaciones de las pulpas y estudio de la fermentación

Los datos fueron sometidos a análisis de varianza (ANOVA), estableciendo la existencia de diferencias significativas mediante prueba de Tukey con nivel de significancia $\alpha=0.05$. Se usó Minitab18 para dichos análisis.

Para la descripción de los resultados de caracterización se incluyó un análisis por componentes principales (PCA). Este análisis permite la reducción de las dimensiones de los datos (resultados de caracterización), por medio de combinaciones lineales (componentes principales) las cuales recogen la mayor parte de la información; es decir, explican la máxima varianza de los datos. Para la obtención de los gráficos de PCA se empleó el programa DART (*Decision Analysis and Ranking Techniques*) (Pavan, M., & Worth, 2008).

3.4.2 Caracterización sensorial

Se asoció una escala cuantitativa a la escala cualitativa de tres puntos: Me gusta (3), Ni me gusta ni me disgusta (2), Me disgusta (1). Cuando el comportamiento de los resultados se acerca a una distribución normal, calculó el puntaje promedio para cada muestra y los resultados se sometieron a análisis de varianza (ANOVA). Si el comportamiento de las variables es discreto o se aleja de la normalidad se aplicó un análisis de Chi². Se usó Minitab18 para dichos análisis.

3.4.3 Selección de mezclas

Se analizaron los resultados de la caracterización fisicoquímica empleando métodos de ordenamiento (*ranking*) que facilitan la toma de decisiones. Se utilizó un modelo de utilidad - conveniencia, con el fin de encontrar la pulpa con mayor potencial para la fermentación láctica. Éste método permite organizar una serie de muestras considerando de forma simultánea más de un criterio. Su fundamento consiste en combinar los diferentes criterios en un índice de ordenamiento global, con el fin de tener un indicador único que permita realizar la clasificación. Para ello se definen las funciones de conveniencia y utilidad (ver detalle ANEXO A).

$$Utilidad = U_i = \sum_{j=1}^p w_j \cdot t_{ij} \quad 0 \leq U_i \leq 1 \quad (3.7)$$

$$Conveniencia = C_i = t_{i1}^{w_1} \cdot t_{i2}^{w_2} \cdot \dots \cdot t_{ip}^{w_p} \quad 0 \leq C_i \leq 1 \quad (3.8)$$

Dónde:

p : número de variables.

w : el peso o valor asignado por el analista a cada criterio.

t : valor obtenido en la función de transformación.

Para la aplicación del método se consideraron las propiedades que se presentan en la Tabla 3-9. Tanto las funciones de transformación como los pesos o valores para cada propiedad fueron asignados considerando los objetivos específicos de este proyecto. En todos los casos se consideró para la transformación una función exponencial, con excepción de la acidez titulable (función exponencial inversa). Los análisis estadísticos se realizaron empleando el programa DART (*Decision Analysis and Ranking Techniques*) (Pavan, M., & Worth, 2008).

Tabla 3-9 Ponderación de variables y función de transformación para el análisis estadístico de ordenamiento

Variable	Peso	Justificación
pH	35%	El pH tiene una gran influencia sobre la viabilidad de los microorganismos. Cada uno tiene un intervalo específico de pH en el que se puede mantener y crecer. Por ejemplo: mohos y levaduras tienen pH óptimo entre 4,0 y 6,8 mientras que las bacterias lo tienen entre 6,5 y 7,5. Se emplea una función exponencial ya que a valores bajos se incrementa la mortandad de microorganismos. De esta manera para valores superiores su puntaje sea mayor.
Sólidos solubles (°Bx)	25%	Los sólidos solubles medidos como grados Brix (°Brix), son una medida indirecta de todas las sustancias que se encuentran disueltas en la pulpa. Teniendo en cuenta que la mayoría de los compuestos solubles de la pulpa son carbohidratos, puede entenderse que al aumentar los grados Brix, lo hacen los carbohidratos disponibles que servirán como fuente de carbono para las bacterias. Por lo tanto, la función exponencial, permite tener un mayor puntaje al tener valores altos de grados Brix.
Acidez titulable	20%	Por medio de la determinación de la acidez titulable es posible establecer una medida de todos los compuestos de carácter ácido presentes en la pulpa. El potencial para el crecimiento y mantenimiento de bacterias ácido lácticas se favorece con la disminución de la acidez. Por lo tanto, se seleccionó una función exponencial inversa, de manera que se tengan valores superiores a menor acidez titulable, donde habrá mayor viabilidad de las bacterias lácticas.
Sólidos totales (%)	20%	Los sólidos totales son una medida de todos los componentes presentes en la pulpa, diferentes al agua. Por tanto, son una medida de los compuestos que pueden servir como nutrientes para los microorganismos. Se emplea una función exponencial de manera que el potencial de fermentación sea mayor al aumentar la cantidad de sólidos totales.

4. Selección de frutas y hortalizas

En este capítulo se presenta la revisión bibliográfica que profundiza en los aspectos considerados para la selección de las frutas y hortalizas sujetas a estudio y proporciona un análisis de los principales criterios empleados. Como resultado de esta revisión bibliográfica se escogieron ocho frutas y cinco hortalizas, sobre las cuales se evaluó el panorama técnico y comercial. El análisis de la información recopilada permitió identificar la necesidad de evaluar la fermentación en mezclas de pulpas de frutas y hortalizas.

4.1 Pérdidas y desperdicios de frutas y hortalizas

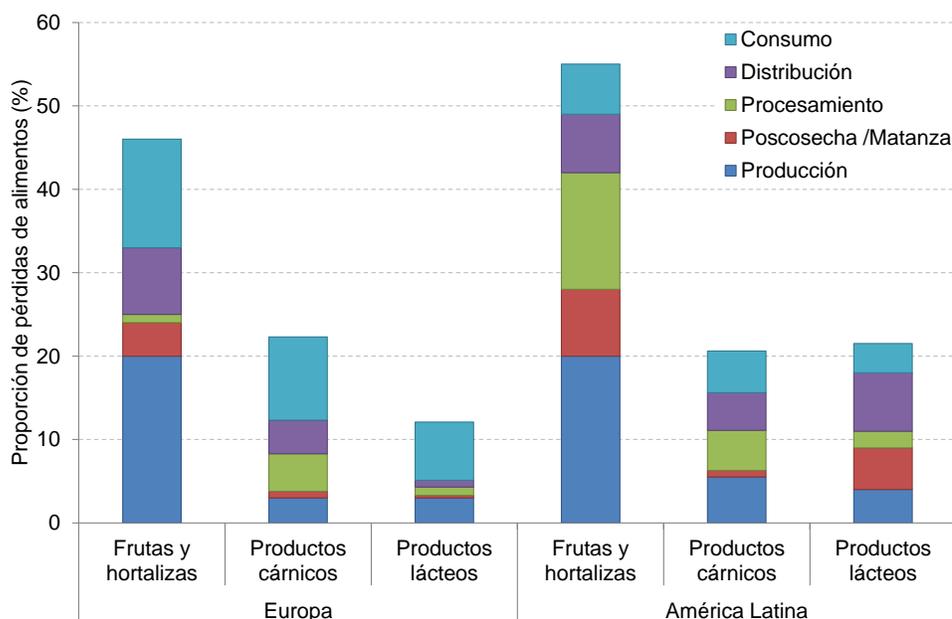
Uno de los aspectos que define el desarrollo de la sociedad y del ser humano es el consumo de alimentos. Depende de diferentes factores como: disponibilidad, accesibilidad, cantidad y calidad, aspectos que se relacionan en el concepto de seguridad alimentaria. Al presentarse pérdidas y desperdicios de alimentos se desaprovechan los esfuerzos realizados para mejorar la seguridad alimentaria, se impacta la sostenibilidad, la disponibilidad, la economía, la nutrición y la salud de la población así como del medio ambiente (CONPES 113, 2008; FAO, 2011, 2014a; Benítez, 2015; DNP, 2016; FAO *et al.*, 2016).

Las pérdidas y desperdicios ocurren en todos los niveles de la cadena alimentaria, por lo que las acciones dirigidas hacia su reducción deben orientarse a todos los eslabones de la cadena, ya que están interrelacionadas. A nivel mundial, se calcula que las pérdidas y desperdicios de alimentos están alrededor de 1300 millones de toneladas anuales, de las cuales entre el 40 y 50% corresponden a frutas y hortalizas (FAO, 2011, 2014b,a; Benítez, 2015; FAO *et al.*, 2016).

Se estima que en los países de bajos ingresos las pérdidas de alimentos se producen por (1) condiciones sociales y culturales, (2) limitaciones técnicas y (3) gestión inadecuada. En los países de ingresos medios y altos están relacionadas con el comportamiento del consumidor, así como con las políticas y normativas existentes para tratar otras

prioridades del sector. Por ejemplo, la aplicación de los altos estándares de calidad e inocuidad alimentaria puede hacer que, alimentos que todavía son inocuos para el consumo humano, se excluyan de la cadena de suministro (FAO, 2011, 2014a,b; Benítez, 2015; FAO *et al.*, 2016).

En la Figura 4.1 se comparan las pérdidas producidas en Europa y América Latina en toda la cadena de suministro.



Fuente: (FAO, 2011).

Figura 4.1: Reporte de pérdidas y desperdicios en los diferentes niveles de la cadena de suministro de alimentos.

Tanto en Europa como en América Latina, el sector de frutas y hortalizas es el que reporta mayores pérdidas, en comparación con lácteos y cárnicos. Llama la atención que las mayores diferencias en las pérdidas se presentan en los niveles de procesamiento, poscosecha y consumo. Las pérdidas en las fases de poscosecha y distribución se deben (1) al deterioro de los productos perecederos en climas cálidos y húmedos, (2) al carácter estacional de algunos cultivos, que conlleva un excedente imposible de vender, y (3) a los altos estándares de calidad establecidos por los comerciantes (FAO, 2011).

En Colombia, las cifras de pérdidas y desperdicios son semejantes al panorama mundial: de los 28,5 millones de toneladas de alimentos disponibles anualmente se pierde y/o

desperdicia el 34%; de éstos, el 81% están en la producción, poscosecha y distribución. Por otra parte, se estima que 62.5% de las pérdidas y desperdicios corresponden al grupo de frutas y vegetales, frente al 2,8% de los productos cárnicos y el 0.3% de los productos lácteos (MinAgricultura, 2014).

En España, las cifras oficiales reportan pérdidas del orden de 7,7 millones de toneladas de alimentos anuales, de las cuales 1.3 toneladas se pierden en los hogares. Cerca del 85% no estaban procesados; es decir, se tiraron de la misma forma en que se adquirieron (Ministerio de Agricultura y Pesca, 2016).

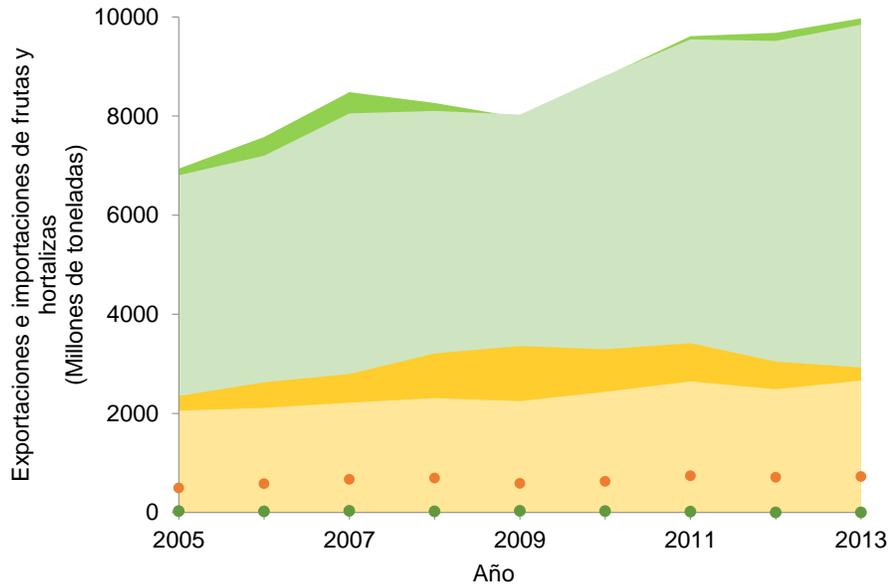
4.2 Producción, comercialización y mercado de frutas y hortalizas en Colombia

Durante las últimas décadas, el mercado internacional ha venido transformándose en respuesta a los cambios y las dinámicas del consumo. La población ha venido adoptando hábitos de vida más saludables donde el consumo de frutas y verduras en cantidad suficiente y de calidad no es excluyente. Por ello, se observa una dinámica de crecimiento en el mercado mundial de frutas y hortalizas, frescas y procesadas, como se puede ver en la Figura 4.2.

Se considera que se presenta un aumento en el volumen comercializado de hortalizas y, en menor grado, de frutas. De acuerdo con las cifras del comercio exterior, las importaciones de hortalizas superan a las exportaciones, mientras que, para las frutas, el comportamiento es opuesto. La participación de Suramérica es más significativa en las frutas que en las hortalizas, y no reporta un crecimiento significativo. Ello puede deberse a que la demanda generada está siendo satisfecha por otros mercados. Cabe resaltar que este aumento se obtiene al analizar las cifras de volumen (en millones de toneladas), sin tener en cuenta que este aumento puede deberse al aumento de la población y no porque esté aumentando en consumo per cápita, tal como se analizará más adelante (ver apartado 4.4)

Simultáneamente, esta situación ofrece oportunidades para el crecimiento económico y social de países en vía de desarrollo, en el campo agrícola, soportado en su enorme potencial productivo, con proyecciones bastantes alentadoras. Se espera que a mediano

plazo el poder adquisitivo de la población aumente y que ésta exija dietas con mayores niveles nutritivos, aumentando así el consumo de frutas y verduras de calidad (FINAGRO, 2014; FAO, 2018).



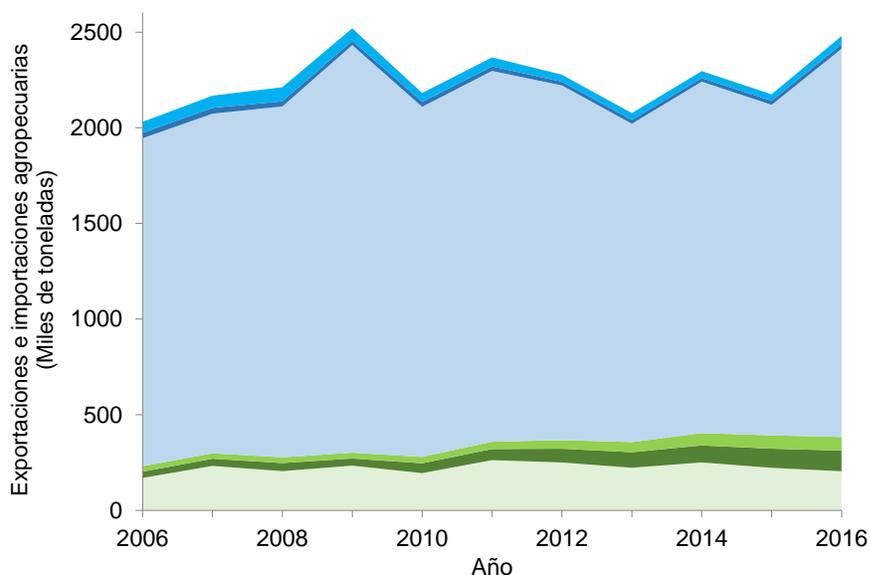
■ Importaciones mundiales de hortalizas ■ Exportaciones mundiales de hortalizas ■ Exportaciones mundiales de frutas ■ Importaciones mundiales de frutas ● Exportaciones de frutas de América del Sur ● Exportaciones de hortalizas de América del Sur. Fuente: (FAOSTAT, 2017).

Figura 4.2: Cifras de comercio exterior de frutas y hortalizas.

Como consecuencia de las múltiples condiciones ambientales que ofrece la geografía colombiana, el desarrollo del sector hortofrutícola representa una importante y potencial fuente de crecimiento de la agricultura, de generación de empleo rural y de equidad social para distintas regiones del país (FINAGRO, 2014; FAO, 2018).

A pesar del panorama económico y del alto potencial identificado, la participación de Colombia en el mercado mundial de frutas es marginal (0.8% del volumen mundial). Esto evidencia el desaprovechamiento de una clara apertura del mercado, en el que sobresalen países que comparten la franja ecuatorial como Perú, Ecuador y Tailandia. Hasta el año 2013, en el mercado internacional de las exportaciones de frutas tropicales, más del 70% correspondieron a las realizadas por América del sur, en las cuales Colombia no participa (Asohofrucol, 2006; Asohofrucol et al., 2009; CCI, 2007; FAOSTAT, 2017).

La *Figura 4.3* presenta el mercado de comercio exterior para las frutas y hortalizas en Colombia. Se observa que difiere del observado a nivel mundial. Para las importaciones hay una tendencia estable, mientras que para las exportaciones es variable. Hay una mayor dinámica en el mercado de frutos comestibles, cortezas de agrios y melón frente a los preparados de diversos alimentos y los preparados de legumbres, hortalizas, frutas y otras plantas.

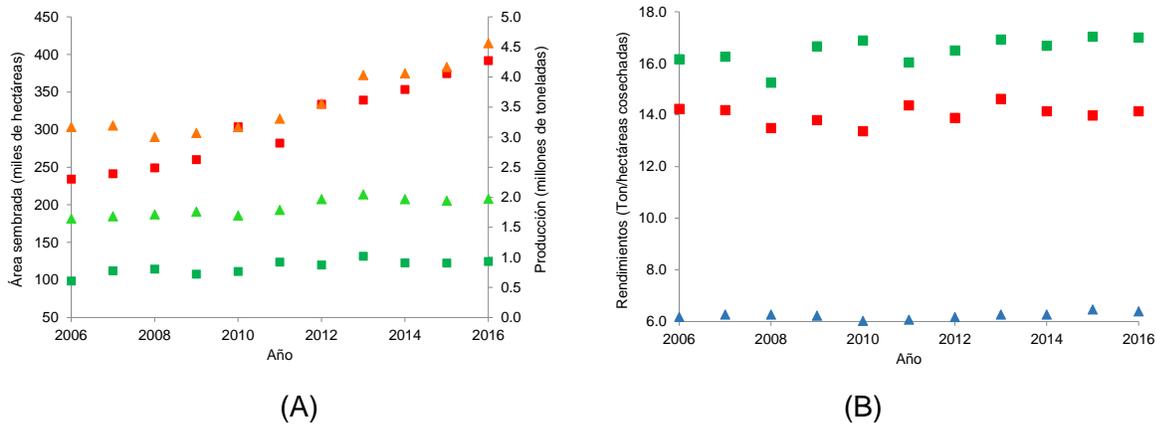


Reporte de cantidades en áreas acumuladas. ■ Exportaciones de alimentos preparados ■ Exportaciones de preparados de legumbres, hortalizas, frutas y otras plantas ■ Exportaciones frutos comestibles, cortezas de agrios y melón ■ Importaciones de alimentos preparados ■ Importaciones de preparados de legumbres, hortalizas, frutas y otras plantas ■ Importaciones frutos comestibles, cortezas de agrios y melón. Fuente: (DANE, 2016, 2018; DNP, 2018).

Figura 4.3: Cifras de comercio exterior para Colombia.

Debido a este panorama y considerando que Colombia es uno de los pocos países con potencial para expandir su área agrícola sin afectar el área de bosques naturales, se proyecta un crecimiento en la producción. Hacia 2020 se espera una expansión de 6 millones de hectáreas, con un incremento de 18 millones de toneladas en la producción de alimentos. Con base en lo anterior, en los últimos años las políticas económicas y sociales han estado dirigidas a fortalecer el sector agropecuario y a identificar productos con mayor potencial e impacto. El objetivo es lograr la soberanía nacional alimentaria y una vinculación en los mercados internacionales (MinAgricultura *et al.*, 2006; CONPES 113, 2008; CONPES 3514, 2008; FINAGRO, 2014).

Como resultado de la implementación de estas políticas de fortalecimiento y apoyo, se observan indicadores de crecimiento del sector agrícola, en especial, para las frutas y las hortalizas. Estos indicadores incluyen aumentos en el área sembrada, en la producción y en las exportaciones, tal y como se muestra en la Figura 4.4A. Adicionalmente, se observa un alto potencial en la mejora del sector si se evalúa el rendimiento de los cultivos de frutales y hortalizas, ya que presenta una tendencia estable y alta en relación con el promedio reportado para el total de la agricultura (Figura 4.4B). Por todo lo expuesto se espera un aumento en el rendimiento de los cultivos y en el promedio de la agricultura, con la implementación y aplicación adecuada de las tecnologías disponibles en el país (CCB, 2006).



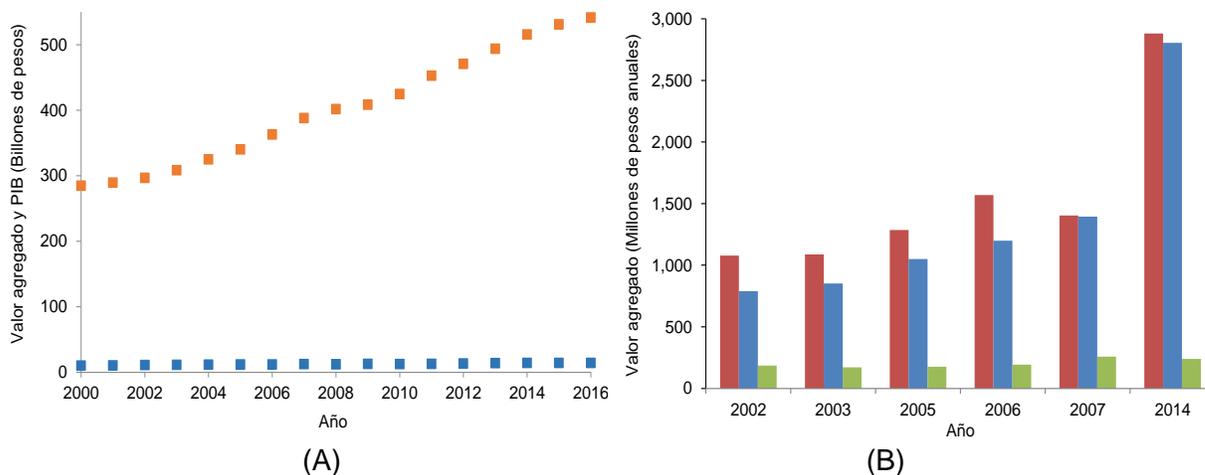
(A). Indicadores de crecimiento para las frutas y hortalizas en Colombia. ■ Área sembrada con cultivos de hortalizas. ■ Área sembrada con cultivos frutales. ▲ Producción de cultivos de hortalizas. ▲ Producción de cultivos frutales. (B). Rendimientos de cultivos calculados como producción/área cosechada. ■ Cultivos de hortalizas. ■ Cultivos de frutales. ▲ Promedio para todos los cultivos. Fuente: (AGRONET. Minagricultura., 2018; DANE, 2018; DNP, 2018).

Figura 4.4: Indicadores de productivos para el sector agrícola.

A pesar de tener indicadores positivos, el crecimiento del sector agrícola es poco significativo en comparación con otros sectores de la economía y frente al producto interno bruto (PBI) del país (Figura 4.5A). Esto se debe a que la mayor parte de la producción se comercializa en fresco, por lo que su valor agregado es muy bajo, en especial al compararse con otros sectores como, por ejemplo, los productos electrónicos.

La dinámica de la industria procesadora de frutas y hortalizas muestra una evolución lenta y aislada en algunos segmentos de la cadena productiva. El desarrollo competitivo del sector hortofrutícola colombiano está íntimamente relacionado con la capacidad de

procesamiento industrial y de generación de valor agregado. Se evidencia el estancamiento del valor agregado para los alimentos de origen vegetal al comparar con cárnicos y lácteos (Figura 4.5B).



(A). Valor agregado sector agricultura, ganadería, caza, silvicultura y pesca (Billones de pesos a precios constantes del 2005). ■ Producto interno bruto. ■ Cultivos de otros productos agrícolas diferentes del café. (B). Dinámica del comportamiento del valor agregado por grupos industriales. ■ Elaboración de productos lácteos. ■ Procesamiento y conservación de cárnicos. ■ Procesamiento y conservación de frutas, legumbres, hortalizas y tubérculos. Fuente: (DANE, 2016; AGRONET. MinAgricultura., 2018; DNP, 2018).

Figura 4.5: Producto interno bruto y valor agregado.

Para ampliar los actuales mercados y aprovechar nuevas oportunidades comerciales, se requiere fortalecer el encadenamiento con el sector primario y su potencial en el mercado nacional e internacional. El incremento de la demanda de los productos hortofrutícolas, con un mayor valor agregado en términos de calidad, sanidad y facilidad de consumo y el desarrollo de la tecnología de procesamiento de alimentos, han contribuido a expandir y diversificar el mercado de frutas y hortalizas, diferenciando los alimentos e introduciendo nuevos productos al mercado (MinAgricultura, 2005; DANE, 2016).

Al considerar aspectos como la necesidad de generación de alternativas al consumo en fresco de frutas y hortalizas, y una simultánea conservación de los mismos, la industria procesadora de frutas y hortalizas podría desempeñar un importante papel dinamizador del sector hortofrutícola, porque integra la producción primaria con el eslabón industrial, en la generación de empleo, incremento en la productividad agrícola y el desarrollo tecnológico y empresarial del sector (MinAgricultura, 2005; DANE, 2016).

4.2.1 Acuerdos de comercio exterior

Colombia cuenta con trece Tratados de Libre Comercio (TLC) vigentes y cinco adicionales suscritos. De estos, hay cuatro de gran importancia para la agenda nacional en materia agropecuaria, con: la Unión Europea, Estados Unidos, Canadá y Corea del Sur. En los tres primeros se concentra el 77% del volumen de las exportaciones agropecuarias, mientras que Corea del Sur representa la primera gran oportunidad de incursionar en el mercado asiático. La Tabla 4-1 presenta las principales frutas y hortalizas identificadas para el comercio desde Colombia hacia la Unión Europea y los Estados Unidos (FINAGRO, 2014).

Tabla 4-1. Frutas y hortalizas priorizadas en los principales TLC con Colombia.

Socio comercial	Productos destacados	Observaciones	Referencias
Unión Europea	Mango, kiwi, papaya, guayaba, maracuyá, uchuva, gulupa, granadilla, tomate de árbol (amarillo), pitahaya amarilla, aguacate hass y banano. El perfil de la oferta exportable de productos procesados incluye: pulpas, deshidratados, concentrados, liofilizados y congelados.	La proyección del mercado y los acuerdos comerciales indican que las frutas y las hortalizas estarán libres de aranceles y en algunos casos puntuales, el mercado colombiano tendrá privilegios especiales de acceso sobre otros países.	(Asohofrucol <i>et al.</i> , 2009; FINAGRO, 2014; Procolombia, 2017a,b,c)
Estados Unidos	Albahaca, apio, banano, banano bocadillo o bananito, cebolla, cilantro, coco, col, coliflor, ciruela, esparrago, espinaca, fresa, higo, lechuga, limón, lulo, mora, mandarina, naranja, perejil, piña, pitahaya amarilla, puerro, repollo, toronja, uchuva, uva, zanahoria y aguacate Hass	Se encuentran en proceso de aceptación algunas pasifloras (maracuyá, curuba, gulupa y granadilla), pimentón, melón, mango, pepino, calabacín, papaya, feijoa, tomate de árbol y limoncillo	(Asohofrucol, 2006, 2013; ICA, 2013; MinAgricultura, 2015).

Al identificar frutas y hortalizas con potencial comercial, aumenta su producción. Dentro de las frutas con potencial productivo están: pitahaya, mango, bananito, lima Tahití, feijoa, aguacate, uchuva, piña, maracuyá, lulo, mora, granadilla y tomate de árbol. Las hortalizas más cultivadas corresponden a: arveja, tomate, cebolla de bulbo, cebolla junca, arracacha, zanahoria, cilantro, habichuela, zapallo y repollo (CONPES 113, 2008; CONPES 3514, 2008; CONPES 3527, 2008).

Desde 1994 el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) identificó y formuló paquetes tecnológicos alrededor de doce frutales con potencial económico y de innovación: piña, naranja, papaya, guayaba, mango, aguacate, mora, tomate de árbol, maracuyá, lulo, guanábana y mandarina. En la actualidad, se considera que estos paquetes tecnológicos no han sido implementados en gran parte del territorio nacional y que los indicadores de productividad pueden mejorar, tal como se muestra en la Tabla 4-2 (ICA, 2013; AGRONET. Minagricultura., 2018).

Tabla 4-2 Exportaciones de fruta y hortalizas en fresco 2000-2015.

Producto	Miles US\$ FOB			
	2000	2005	2010	2015
Banano fresco	396634	411686	608610	672856
Uchuva fresca	6645	17662	18024	19824
Banano bocadillo	2470	3570	5078	8012
Passifloras frescas	1146	3195	2917	23984
Tomate de árbol	1139	1001	1082	1068
Mangos frescos o secos	996	296	353	1092
Pitahaya fresca	796	741	1460	2803
Fresas frescas	137	366	233	339
Limonas frescos y secos	135	422	371	185
Naranja	70	874	2099	2894
Piña fresca o seca	68	287	420	3458
Papaya fresca	38	208	220	58
Zanahoria y nabos frescos	45	6	15	6
Remolacha	106	3	4	4
Mandarina	6	16	9	19
Lechugas repolladas frescas	13	32	421	141
Coliflor y brócoli fresco	5	229	15	59
Espinacas	1	6	3	10
Calabazas y calabacines frescos	-	-	-	23

Fuente: (AGRONET. Minagricultura., 2018).

4.2.2 Organización por cadenas productivas

Con el fin de mejorar la competitividad del sector agropecuario, se han establecido múltiples políticas de fortalecimiento del sector, que enfocan los estímulos hacia cadenas productivas y priorizan aquellas con mayores desarrollos y/o potenciales de crecimiento. Se han orientado a potenciar las ventajas comparativas de unidades productivas en territorios específicos de la geografía nacional, de manera que se tenga una dinámica transversal, incluyente, económica, social y ambientalmente sostenible (CONPES 3439, 2006; CONPES 3527, 2008; CONPES 3668, 2010).

Esta identificación territorial ha llevado al establecimiento y formalización de iniciativas de vinculación de pequeños productores en asociaciones, federaciones y cooperativas. Estas agrupaciones funcionan como eslabones en las cadenas productivas, lo cual ha facilitado el acceso del sector productivo, al financiamiento, a la transferencia tecnológica y a la capacitación especializada (Asohofrucol, 2006, 2013; CCB, 2006; CONPES 3514, 2008; Asohofrucol *et al.*, 2009; DNP, 2014).

Se cuenta con cadenas productivas para: aguacate, algodón, alimentos balanceados, arroz, banano, cacao, café, caña de azúcar, cítricos, coco, fique, flores y follajes, fresa, guayaba, hortalizas, mango, mora, palma, panela, papa, pasifloras, plantas aromáticas y medicinales, plátano, sábila, tabaco, yuca y ñame. Adicionalmente están los Consejos Nacionales de: caducifolios (manzana, durazno, pera, ciruela) y se trabaja en la formalización de las solanáceas (uchuva, tomate de árbol y lulo), pitahaya, papaya, piña, guanábana, chontaduro e higos (MinAgricultura, 2015).

Otros ejemplos de asociación son:

- Productos frutícolas: Fedemango en Bogotá; Asocítricos en Pereira; Corpopitahaya en Bogotá, Asopitahaya en Roldanillo (Valle del Cauca); Asomaracuyá en Manizales; Cooguayaba, Asoguayaba y otras en Barbosa (Santander); Corpoginebra para uva Isabella en Ginebra (Valle del Cauca), Uvasan en San Gil (Santander), Asoprouva en Villa del Rosario (Norte de Santander), Hortifrucop – EPS en Tauramena (Casanare); Granadilleros en Urao (Antioquia), Limoneros en Dorada (Caldas); Exportadores de tomate de Árbol, entre Ríos, Antioquia, Moreros de Guarne, Antioquia y Piñeros en Lebrija, Santander, entre otras.
- Productos hortícolas: Asocampo y Asphorta en Antioquia; Hortifresh, Asoprost y Usochicamocha en Boyacá; Asoagro en Córdoba; Coophorticota, Hortifresco, Coomagro y APAC en Cundinamarca; UDRAR y Cooperativa de productores Dibulla en la Guajira; Asohofrucol y Asprosac en Magdalena; Fedeasur en Nariño; Asudra en Norte de Santander, entre otras (CCI, 2007).

En la Tabla 4-3 y Tabla 4-4 se presentan las cifras de indicadores productivos de cultivos hortofrutícolas en Colombia reportadas por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural.

Tabla 4-3 Indicadores productivos en cultivos de frutas en Colombia.

Cultivo	Área sembrada (miles ha)			Producción (miles t)			Rendimiento (t/ha)		
	2007	2009	2011	2007	2009	2011	2007	2009	2011
Aguacate	17.6	19.3	24.5	174.0	189.1	215.1	9.9	9.8	8.7
Banano	29.2	27.1	33.2	258.2	258.1	333.7	8.8	9.5	10.1
Caducifolios	0.2	0.1	0.05	1.2	0.5	0.3	8.0	4.8	7.5
Cítricos	33.3	27.6	29.0	610.7	474.5	467.0	18.3	17.2	16.1
Curuba	2.3	1.3	1.3	23.5	15.1	14.3	10.3	11.4	10.6
Durazno	1.2	1.5	1.5	15.2	20.0	19.9	12.9	13.6	13.3
Feijoa	0.3	0.2	0.1	2.2	1.7	1.1	8.8	9.0	8.2
Fresa	1.3	1.2	1.1	38.4	48.7	45.0	29.4	41.7	39.7
Granadilla	3.6	4.9	3.7	44.1	53.2	38.9	12.2	10.9	10.4
Guanábana	2.2	2.2	2.3	21.7	19.3	23.4	9.7	8.7	10.4
Guayaba	13.4	12.5	12.2	141.4	123.7	121.8	10.5	9.9	10.0
Limón	7.4	5.6	6.2	100.3	69.1	83.4	13.6	12.4	13.5
Lulo	6.2	6.4	6.8	49.8	52.1	57.7	8.0	8.2	8.5
Mandarina	2.5	7.8	11.4	33.7	99.7	115.2	13.4	12.8	10.1
Mango	17.8	19.6	18.6	185.0	239.8	221.0	10.4	12.2	11.9
Manzana	0.3	0.2	0.1	2.8	1.3	1.2	9.3	8.8	10.1
Maracuyá	6.3	5.6	5.3	113.8	91.3	79.7	17.9	16.2	14.9
Mora	10.6	11.8	11.7	93.8	100.2	94.3	8.8	8.5	8.1
Naranja	13.1	13.8	16.2	200.4	194.2	260.0	15.3	14.1	16.0
Papaya	5.7	5.6	5.0	175.0	185.9	153.1	30.9	33.4	30.8
Piña	10.9	8.0	13.0	434.5	326.7	512.3	40.0	40.7	39.5
Pitahaya	0.5	0.6	0.7	5.0	5.1	6.6	9.4	8.3	9.5
Tomate de árbol	7.5	7.3	8.4	125.6	131.1	129.5	16.8	17.9	15.5
Uchuva	0.9	1.1	0.7	15.7	19.3	10.8	17.1	17.8	14.5
Uva	2.4	2.6	2.3	35.9	38.1	24.2	15.1	14.8	10.7

Fuente: (MinAgricultura, 2012, 2013).

Tabla 4-4 Indicadores productivos en cultivos de hortalizas en Colombia

Cultivo	Área sembrada (miles ha)			Producción (miles t)			Rendimiento (t/ha)		
	2007	2009	2011	2007	2009	2011	2007	2009	2011
Acelga	0.2	0.1	74	2.8	1.3	1.1	17.6	15.9	14.2
Ahuyama	3.7	4.1	4.6	52.5	51.0	61.1	14.1	12.4	13.3
Calabaza	0.2	0.05	0.3	3.1	0.5	3.5	13.3	9.6	12.9
Coliflor	0.5	0.5	0.5	9.2	11.1	10.5	19.6	20.9	19.1
Espinaca	0.2	0.4	0.4	4.1	8.2	7.9	18.3	20.9	20.3
Lechuga	1.6	3.0	3.2	29.1	58.4	56.3	18.1	19.8	17.8
Remolacha	0.6	0.9	0.8	11.9	18.7	21.4	18.6	19.5	25.8
Tomate	15.5	15.3	15.2	453.9	515.2	595.3	29.4	33.6	39.2
Zanahoria	9.1	10.8		236.5	288.5	9.9	26.0	26.6	26.6

Fuente: (MinAgricultura, 2012, 2013).

Las especies de mayor impacto económico y social por su área sembrada se concentran en banano (13.7%), cítricos (12.0%), aguacate (10.1%) y mango (7.7%). Mientras que los cultivos con mayor desarrollo cuentan con los mejores rendimientos como es el caso de la fresa (39.7 t/ha), la piña (39.5 t/ha) y la papaya (30.8 t/ha). Gracias al desarrollo

tecnológico implementado, la piña presenta uno de los mayores rendimientos promedio entre las especies transitorias. El Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR) plantea una apuesta exportadora con horizonte al año 2020 priorizando ocho cultivos de ciclo corto (mora, tomate de árbol, piña, lulo, maracuyá, granadilla, banano bocadillo, uchuva) y siete cultivos de ciclo largo (aguacate, feijoa, lima Tahití, mango, marañón, macadamia, pitahaya) (Tafur and Toro, 2007).

En el sector hortícola, los cultivos de mayor importancia (en área sembrada) son arveja, ñame, tomate, cebolla junca y zanahoria. El resto de los cultivos participaron con menos del 1%. Aunque presenta cifras significativamente inferiores al de los productos frutales, este sector sobresale con rendimientos superiores al 20% en promedio, con excepción del tomate, cuyos indicadores son estimulados por los requerimientos del sector industrial de salsas e implementación de tecnología como la producción en invernadero (DNP, 2004; Tafur and Toro, 2007; Galindo Triana, 2015).

Bajo un modelo de competitividad en el que se ponderaron diferentes variables (agronómicas, económicas, sociales institucionales, ambientales, de tradición de producto y productores) se identificaron diez cultivos de importancia en la producción nacional: tomate, cebolla cabezona, zanahoria, cebolla junca, repollo, ahuyama, habichuela, pimenta, arveja y lechuga. Entre los cultivos de mayor extensión de siembra se destacaron: arveja, cebolla cabezona, tomate, zanahoria, cebolla junca, habichuela, ahuyama, repollo, pimentón y lechuga con el 90% del área total sembrada en el 2007. Se identifican como productos con potencial exportador: esparrago verde, cebolla cabezona, brócoli, alcachofa, ají y lechuga (CCI, 2007; Asohofrucol *et al.*, 2009).

En el marco del programa “Visión 2019” del Departamento Nacional de Planeación (DNP), cuyas metas están orientadas a desarrollar el potencial productivo y diversificar las exportaciones del país, se resaltan los siguientes productos: ají, brócoli, cebolla, espárragos, pimentón, lechuga y alcachofa. Se identifican como potenciales para el mercado interno: el tomate, el ajo, la arveja, la habichuela, la zanahoria, la ahuyama o calabacín y los guisantes. Se espera que todos los productos incluidos en la Visión 2019 amplíen el área sembrada en más de dos millones de hectáreas, incrementen la producción en 27.3 millones de toneladas y generen casi tres millones de nuevos empleos (DNP, 2005).

Se consideró que tanto las frutas como las hortalizas seleccionados fueran productos con altas pérdidas por sobreproducción. A pesar de no contar con datos específicos que permitan la comparación, se prevee que aquellos cultivos que han superado la etapa de investigación del desarrollo del cultivo y del impacto por plagas y enfermedades son más susceptibles a las pérdidas si tienen una producción creciente. Se tuvo en cuenta que los productos seleccionados pudieran implementar desarrollos tecnológicos para el mejoramiento de la etapa productiva, con indicadores de productividad en ascenso y con un expectativa de aumento comercial. Lo anterior se facilita cuando existe una cooperación entre productores, como se presenta cuando existe una cadena productiva definida.

En conclusión, se seleccionaron frutas y hortalizas rojas (mora, fresa, guayaba, remolacha), amarillas (mango, uchuva, maracuyá, ahuyama y zanahoria) y verdes (feijoa, lulo, espinaca y guatila).

4.3 Panorama técnico y comercial de las frutas y hortalizas seleccionadas

Una vez seleccionadas las frutas y las hortalizas para la investigación, se evaluó el panorama técnico y comercial específico, con el objetivo de contar con datos específicos de producción (área cosechada, volumen de producción, rendimiento del cultivo y precios) y consumo que permitan verificar la selección.

Se consideró que aquellas frutas con indicadores productivos en ascenso son más susceptibles a las pérdidas por sobreproducción y al mismo tiempo pueden destinar una parte del volumen obtenido al procesamiento. Inicialmente se realizó la caracterización botánica de cada una de las frutas y hortalizas consideradas.

Posteriormente se analizaron algunos indicadores de calidad, productivos y de comercialización. La información recogida para la caracterización botánica de cada una de las frutas y hortalizas seleccionadas puede consultarse en la Tabla 4-5.

Tabla 4-5. Información de botánica de las frutas y las hortalizas seleccionadas.

Fruta / Hortaliza (Nombre científico)	Descripción botánica
<p>Mora de Castilla (<i>Rubus glaucus Benth</i>)</p> 	<p>Planta perenne, arbustivo semi-erecto. Está compuesta por varios tallos espinosos que llegan hasta los 3 m de altura, con un diámetro de 1-2 cm. Las hojas tienen tres folíolos, ovoides de 4 a 5 centímetros de largo con espinas ganchudas. El sistema radicular es profundo, puede llegar a profundizar más de un metro dependiendo del suelo y el subsuelo. El fruto, es una baya formada por pequeñas drupas adheridas a un receptáculo, de forma esférica o elipsoidal y de tamaño variable; su color es verde al formarse y pasa por el rojo hasta llegar al morado oscuro cuando llega a la madurez.</p>
<p>Fresa (<i>Rosacea fragaria chilensis</i>)</p> 	<p>Planta perenne, de tipo herbáceo. Los tallos son generalmente simples, más o menos erectos y anuales. Las hojas se agrupan en falsas rosetas, con los segmentos ovalo-rómbicos, distalmente dentados. Posee un sistema radicular se compone de raíces y raicillas, de profundidad variable, dependiendo del tipo de suelo y la presencia de patógenos en el mismo. En condiciones óptimas pueden alcanzar los 2-3 m, aunque lo normal es que no sobrepasen los 40 cm. Cada óvulo fecundado da lugar a un fruto de tipo aquenio. El desarrollo de los aquenios, distribuidos por la superficie del receptáculo carnoso, estimula el crecimiento y la coloración de éste que va del verde al rojo intenso cuando está maduro.</p>
<p>Guayaba (<i>Psidium guajava</i>)</p> 	<p>Arbusto frondoso que puede llegar a los 6m de altura. Sus hojas son simples, oblongas o elípticas de color verde brillante a verde parduzco, muy fragantes cuando se estrujan. Sus flores son solitarias, ocasionalmente se presentan en racimos hasta de 8 cm, siendo axilares, con sépalos de 4 a 5, de color verde en el exterior y blanco en el interior. Su fruto es del tipo baya, de hasta de 8 cm de diámetro, con formas semiesférica, ovoide o en forma de pera, con el cáliz persistente en el ápice, carnosas, de color rosado, verde e intermedios de los anteriores a crema amarillento, de olor fragante y sabor agridulce. La madurez se observa en la cáscara cuando alcanzan un color verde amarillento, o amarillo rosado.</p>
<p>Remolacha (<i>Beta vulgaris</i>)</p> 	<p>Durante el primer año la remolacha azucarera desarrolla una gruesa raíz napiforme y una roseta de hojas. En el segundo, emite una inflorescencia ramificada en panícula, pudiendo alcanzar hasta un metro de altura. Las flores son poco llamativas y hermafroditas. La fecundación es generalmente cruzada, porque sus órganos masculinos y femeninos maduran en épocas diferentes. La raíz es pivotante, casi totalmente enterrada, de piel-amarillo verdosa y rugosa al tacto, constituyendo la parte más importante del órgano acumulador de reservas. Las semillas se encuentran adheridas al cáliz y son algo leñosas.</p>

Fruta / Hortaliza (Nombre científico)	Descripción botánica
<p data-bbox="349 241 560 304">Mango Tommy (<i>Mangifera indica</i>)</p> 	<p data-bbox="657 252 1429 609">Planta perennifolia con hojas alternas, simples, dispuestas en espiral, algo coriáceas, de forma variable, entre elípticas y lanceoladas. Oscilan entre 8 y 40 cm de longitud de color verde oscuro cuando son maduras. Las hojas emergen de pecíolos cortos, hinchados en la base. Su fruto es una drupa y tiene un mesocarpo comestible de diferente grosor según los cultivares y las condiciones de cultivo, de forma generalmente ovoide-oblonga, notoriamente aplanada, redondeada, u obtusa a ambos extremos, de 4-25 cm. de largo y 1.5-10 cm. de grosor. El color puede estar entre verde, amarillo y diferentes tonalidades de rosa, rojo y violeta. La cáscara es gruesa, frecuentemente con lenticelas blancas prominentes; la carne es de color amarillo.</p>
<p data-bbox="332 682 576 745">Uchuva (<i>Physalis peruviana</i>)</p> 	<p data-bbox="657 640 1429 1081">Hierba arbustiva, perenne, posee un tallo algo quebradizo de color verde, con vellosidades de textura muy suave al tacto, con hojas acorazonadas y pubescentes, alcanza una altura de 1-1.5m, mediante un patrón de crecimiento simpodial. Las flores amarillas y acampanadas son polinizadas por insectos o por el viento. El cáliz, pequeño al comienzo del desarrollo del fruto le protege contra insectos, pájaros, patógenos y condiciones climáticas extremas. Crece hasta formar una estructura similar a una vejiga de unos 5cm, la cual encierra completamente el fruto. Al madurar adquiere una textura similar a la del pergamino y su color pasa del verde al amarillo. En climas cálidos la planta puede florecer y fructificar durante todo el año. Los frutos casi redondos son bayas amarillas y brillantes que miden 1.25-2.5 cm de diámetro, pesan alrededor de 4-10 g. y contiene muchas semillas de forma lenticular.</p>
<p data-bbox="349 1102 560 1165">Maracuyá (<i>Passiflora edulis</i>)</p> 	<p data-bbox="657 1102 1429 1480">Planta trepadora, vigorosa, leñosa, perenne, de 3 a 8 m de altura, presenta tallos verdes, acanalados, con zarcillos axilares que se enrollan en forma de espiral y son más largos que las hojas, unifoliadas de color verde pálido, de forma oblonga, punta obtusa, márgenes subserrados, pecíolo corto y alado. El fruto es una baya globosa u ovoide de color entre rojo intenso a amarillo cuando está maduro, las semillas con arilo carnoso muy aromáticas, miden entre 6 y 7 cm de diámetro y entre 6 y 12 cm de longitud. El exocarpo es liso y está recubierto de cera natural que le da brillo. El color varía desde el verde, al amarillo cuando está maduro. El endocarpo es la envoltura (saco o arilo) que cubre las semillas de color pardo oscuro. Contiene el jugo de color amarillo opaco, bastante ácido y muy aromático.</p>
<p data-bbox="357 1512 552 1575">Zanahoria (<i>Daucus carota</i>)</p> 	<p data-bbox="657 1501 1429 1890">Plantas anuales o bianuales, alógamas autocompatibles de hasta 1.6 m de altura, con la raíz napiforme o fusiforme cilíndrica, cónica o redondeada, blancuzca, amarillo rojiza o anaranjada, con los tallos solitarios, cilíndricos erectos estriados e hispídos y muy ramificados. En el extremo del tallo aparecen umbelas compuestas de pequeñas flores blancas, amarillentas o azuladas. Las hojas tienen los pecíolos largos, doble o triplemente pinnado-partidas, y toman una disposición en roseta. Su raíz carnosa presenta grandes diferencias de color, forma y tamaño, según variedades. Se trata de una raíz hipertrofiada, principalmente a base de parénquima cortical. Es importante destacar que, dentro de una misma variedad, se presentan diferencias importantes en longitud y grosor de las raíces.</p>

Fruta / Hortaliza (Nombre científico)	Descripción botánica
<p data-bbox="256 323 488 384">Ahuyama (<i>Cucurbita máxima</i>)</p> 	<p data-bbox="581 285 1354 684">Hierba anual caulescente, de hábito trepador; su tallo es anguloso y densamente pubescente, con zarcillos apicales con los que se fija a la vegetación y al suelo. Las hojas son anchas, cordadas a ovadas, de hasta 25 por 30 cm de superficie, de márgenes serrados, ubicadas al cabo de un pecíolo elongado de hasta 30 cm. El fruto es una baya de gran tamaño; lisa o segmentada, pocas veces con la superficie granulosa, y ovoide a cilíndrica. La corteza es verde a blanca o naranja claro, a veces irregular; la pulpa es blanquecino-verdosa en su estado inmaduro, virando al naranja a medida que alcanza la madurez. Es de apariencia fibrosa, dulce y firme. En el interior posee semillas elípticas, achatadas, blanco grisáceas o amarillentas, de hasta 1 x 2 cm, con un núcleo blanco, dulce y rico en aceite.</p>
<p data-bbox="269 695 475 751">Feijoa (<i>Acca sellowiana</i>)</p> 	<p data-bbox="581 705 1354 1014">Árbol de porte bajo, perenne, de copa redondeada; por su emisión de brotes en la parte inferior conlleva una apariencia arbustiva. Las hojas son de forma elíptica, coriáceas y de pecíolos cortos; son semipersistentes y, si no se podan, las ramas se desfolian. Flores hermafroditas axilares, pediceladas con cuatro pétalos blancos externos y color púrpura en la otra cara. El fruto es una baya de color verde intenso, de textura lisa o rugosa y de forma variable; su pulpa blanca y carnosa, puede contener entre 20 - 40 semillas, es de sabor agrídulce y aroma agradable.</p>
<p data-bbox="250 1094 495 1150">Lulo (<i>Solanum quitoense</i>)</p> 	<p data-bbox="581 1045 1354 1497">Arbusto de 2.5 – 3 m de alto, con tallo sin espinas, leñoso y ramificado. Sus hojas son oblongas ovaladas de 30 – 40 cm de largo, con nervaduras marcadas; el haz de la hoja es verde con cresta y densa pubescencia, al igual que el pecíolo. El color de sus flores varía del blanco hasta crema, se forman en las axilas de las ramas agrupadas en racimos. Los sépalos de las flores son de coloración verde en el haz mientras que en el envés presentan tonalidad morada; los pétalos son de color claro en la cara superior; tienen cinco anteras amarillas con dehiscencia apical. El fruto es globoso-ovoide de coloración amarillo - naranja, con un diámetro entre 4 – 7 cm. Está cubierto por una densa capa de vellos finos, los cuales son fácilmente removibles. Internamente, se divide en cuatro compartimentos separados por particiones membranosas, llenos de pulpa de color verdoso o amarillento y numerosas semillas pequeñas y blanquecinas.</p>
<p data-bbox="256 1518 488 1575">Espinaca (<i>Spinacia oleracea</i>)</p> 	<p data-bbox="581 1518 1354 1877">En una primera fase la planta forma una roseta de hojas de duración variable según condiciones climáticas y posteriormente emite el tallo. De las axilas de las hojas o directamente del cuello surgen tallitos laterales que dan lugar a ramificaciones secundarias, en las que pueden desarrollarse flores. Sus hojas son caulíferas, más o menos alternas y pecioladas, de forma y consistencia muy variables, en función de la variedad. Color verde oscuro, pecíolo cóncavo y a menudo rojo en su base, con longitud variable, que va disminuyendo poco a poco a medida que soporta las hojas de más reciente formación y va desapareciendo en las hojas que se sitúan en la parte más alta del tallo.</p>

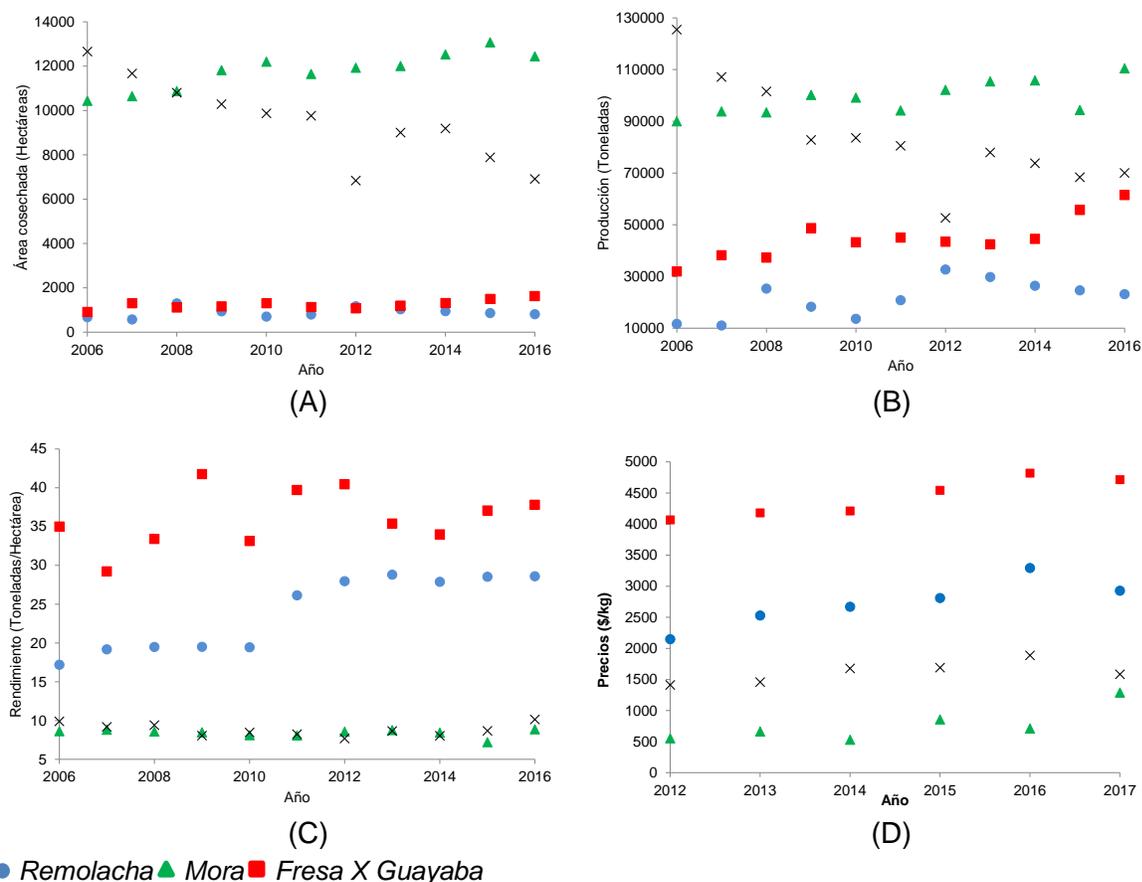
Fruta / Hortaliza (Nombre científico)	Descripción botánica
<p data-bbox="354 239 548 296">Guatila (<i>Sechium edule</i>)</p> 	<p data-bbox="659 260 1435 562">Raíz: Tuberosa y ramificada. Tallos: Angulosos, con zarcillos trepadores. Fruto: Espinoso, esfericopiriforme de pericarpio membranoso y consistente. Propagación: de forma sexual la propagación se hace plantando el fruto maduro entero en el suelo con buena provisión de materia orgánica. Es costumbre realizar la siembra utilizando el fruto cuando está comenzando a germinar, plantarlo con el brote hacia abajo, o simplemente acostarlo, para cubrirlo después con 5 o 6 cm de tierra. De forma asexual se puede realizar por medio de esquejes o por brotes o retoños que nacen en la parte basal de la planta.</p>

Fuente:(Agroes.es, 2019; Asohofrucol, 2019a,b; Encolombia, 2019; Infoagro, 2019a,b,c).

En las figuras 4.6 a 4.8 se presentan algunos indicadores de producción y comercialización para las frutas y hortalizas seleccionados. Se consideró que al tener una producción creciente, el cultivo puede ser susceptible a tener pérdidas por sobreproducción si el comportamiento en el consumo es estable. Cabe resaltar que aunque la mayor parte del consumo se realiza en fresco, éste también puede ser un indicador indirecto del consumo como alimento procesado. Se presentan de acuerdo con el color de los productos: rojos (mora, fresa, guayaba y remolacha) en la Figura 4.6, amarillos (mango, uchuva, maracuyá, ahuyama y zanahoria) en la Figura 4.7 y verdes (feijoa, lulo, espinaca y guatila) en la Figura 4.8.

Los cultivos de mora y guayaba requieren grandes áreas para su cosecha (A) en comparación con la remolacha y la fresa. Con excepción de la guayaba todas presentan pequeños aumentos en este indicador. Las áreas cosechadas para la remolacha y la fresa han sido similares, mientras que para los cultivos de mora y guayaba son alrededor de 10 veces mayores.

En cuanto a la cantidad producida (B), las diferencias que se presentan son mayores y no guardan una correspondencia con las áreas cosechadas. Por lo tanto, este comportamiento influye en los rendimientos de cada cultivo (C), en donde el cultivo de fresa presenta los mayores rendimientos y una alta variabilidad. El rendimiento del cultivo de remolacha muestra un aumento, mientras que los cultivos de mora y guayaba presentan una tendencia constante alrededor de un valor bajo. En los precios por kilogramo no se observa un aumento significativo en el periodo de tiempo analizado para ninguno de los cultivos considerados.



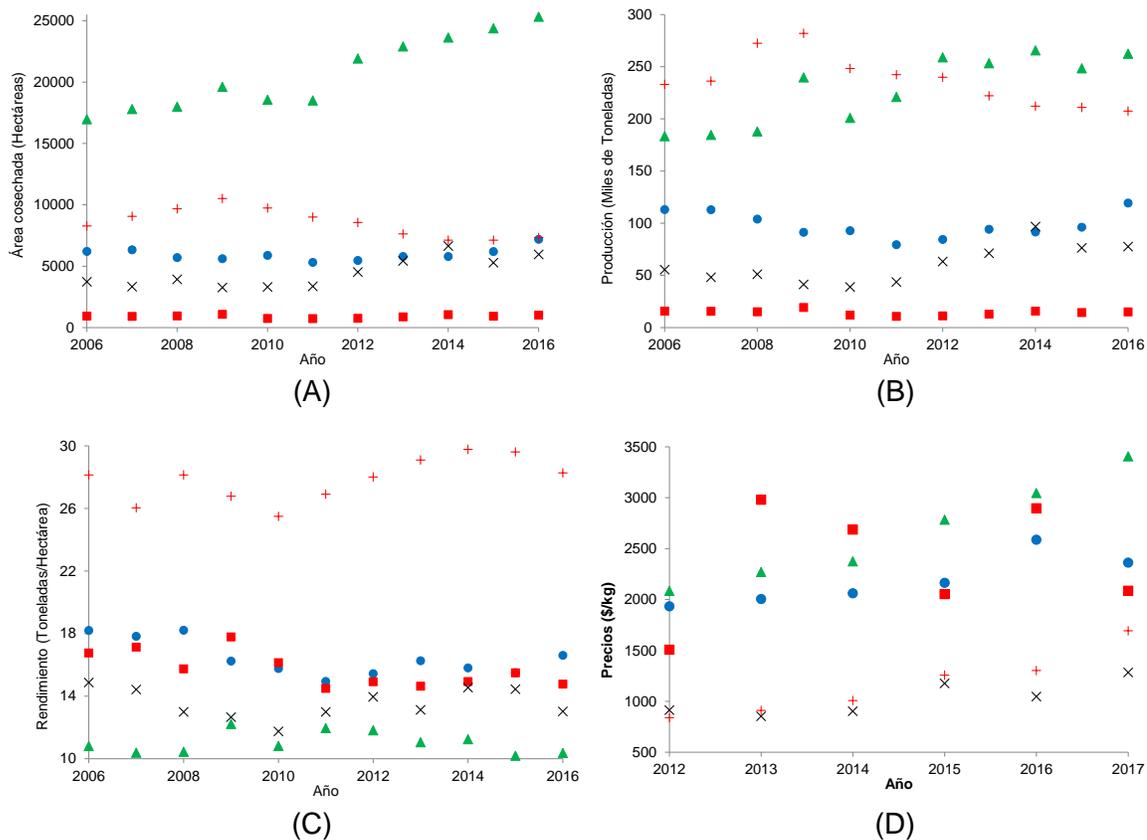
A. Área cosechada en todo el territorio colombiano. B. Volumen de producción. C. Rendimiento del cultivo (Área cosechada/Volumen producido) D. Precios por kg. Fuente: (DANE, 2016; AGRONET. Minagricultura., 2018; Corabastos, 2018).

Figura 4.6: Indicadores de producción y comercialización de productos hortofrutícolas rojos.

En los datos de los productos amarillos reportados en la Figura 4.7 se observa un crecimiento en el área cosechada de mango (A), siendo casi el doble que la empleada para los otros cultivos. La uchuva y el maracuyá muestran estabilidad, mientras que la ahuyama presenta un ligero aumento y la zanahoria un descenso.

Para la producción (B), se observa una tendencia similar a la discutida anteriormente, aunque la cantidad de mango producida es menor para el área cosechada empleada. Los rendimientos de los cultivos considerados (C) no tienen una tendencia definida para el periodo de tiempo analizado. Los precios (D) de la zanahoria y la ahuyama tienen una

tendencia creciente, pero el crecimiento en el mango es mucho mayor. Los precios de la uchuva son fluctuantes.



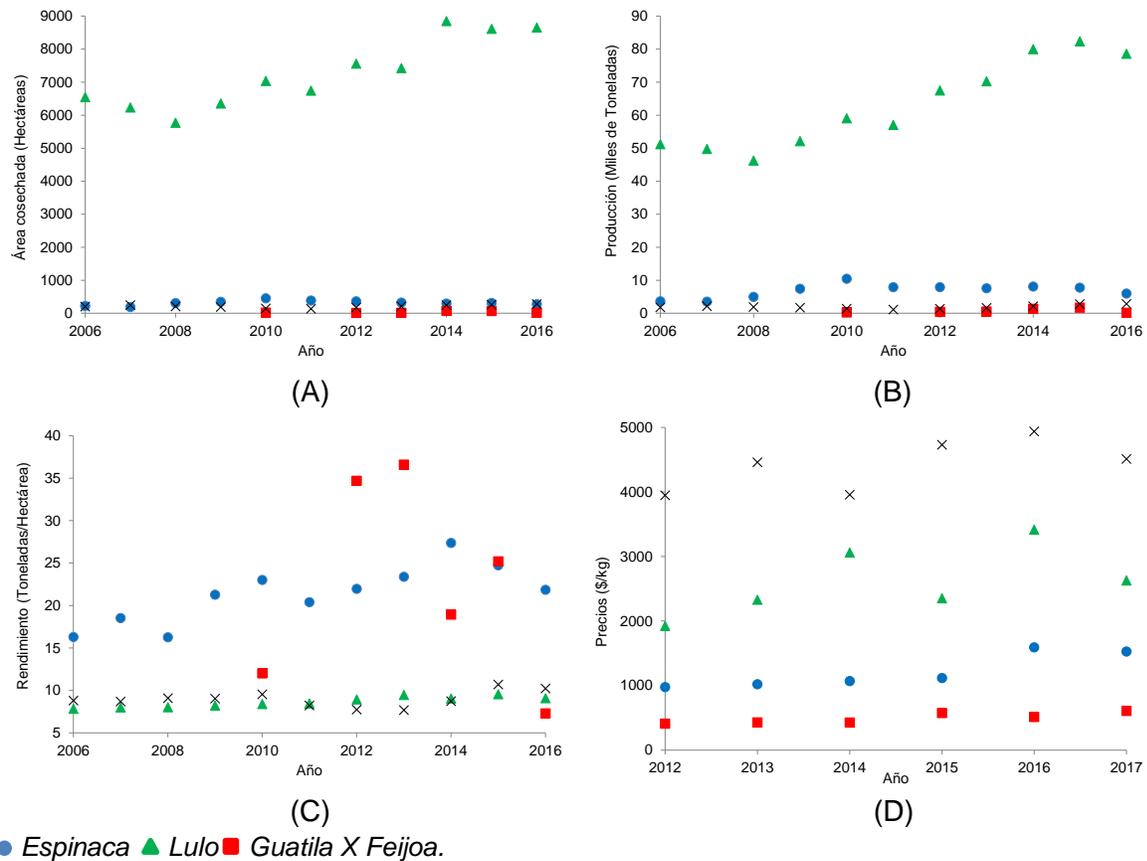
● Maracuyá ▲ Mango ■ Uchuva X Ahuyama + Zanahoria.

A. Área cosechada en todo el territorio colombiano. B. Volumen de producción. C. Rendimiento del cultivo (Área cosechada/Volumen producido) D. Precios por kg. Fuente: (DANE, 2016; AGRONET. Minagricultura., 2018; Corabastos, 2018).

Figura 4.7: Indicadores de producción y comercialización para productos hortofrutícolas amarillos.

Para los productos hortofrutícolas verdes (Figura 4.8) las cifras de área cosechada (A) y volumen de producción (B) de lulo resaltan sobre todos los demás con una tendencia creciente en el tiempo.

Los mayores rendimientos (C) son conseguidos por la guatila, que a la vez tienen mayor variación. Sin considerar esos datos, la espinaca presenta valores superiores a los del lulo y la feijoa. En los precios (D), tanto el lulo como la feijoa tienen una tendencia fluctuante, la espinaca presenta un pequeño aumento y el precio de la guatila es el más estable e inferior a todos (por kilogramo de producto).



A. Área cosechada en todo el territorio colombiano. B. Volumen de producción. C. Rendimiento del cultivo (Área cosechada/Volumen producido) D. Precios por kg. Fuente: (DANE, 2016; AGRONET. Minagricultura., 2018; Corabastos, 2018)

Figura 4.8: Indicadores de producción y comercialización de productos hortofrutícolas verdes.

La disponibilidad de las frutas y hortalizas seleccionadas se confirmó con los resultados publicados por el Instituto Colombiano de Bienestar Familiar (ICBF) para la Hoja de Balance de Alimentos. Se reporta que de los alimentos disponibles para el consumo, las frutas tuvieron la mayor participación (20%), mientras que las hortalizas solo tienen un 5%. Estas proporciones no son suficientes para cubrir las recomendaciones de consumo. En consecuencia y de acuerdo con el Plan de Seguridad Alimentaria 2012 – 2019, dentro del grupo de alimentos priorizados están las siguientes frutas y hortalizas: naranja, guayaba, banano, tomate de árbol, mora, mango, papaya, ahuyama, brócoli, cebolla, zanahoria, habichuela, espinaca, brócoli y tomate (ICBF, 2015).

4.4 Consumo de frutas y hortalizas

En general, el consumo de alimentos está determinado por diferentes factores: (1) los culturales, (2) las creencias, (3) las actitudes, (4) los patrones y los hábitos alimentarios, (5) la educación alimentaria y nutricional, (6) la información comercial y nutricional, (7) el nivel educativo, (8) la publicidad, (9) el tamaño y la composición de la familia (CONPES 113, 2008; ICBF *et al.*, 2010; Fao and MinSalud, 2013).

Tanto las afinidades (impresiones o emociones) del consumidor, como los impactos positivos a la salud que proporcionan las frutas y las hortalizas influyen en la aceptación. Por ejemplo, el açaí en el mercado norteamericano: parte de la población que inicialmente rechazó el fruto amazónico por su perfil sensorial, luego de conocer que es un producto rico en vitaminas, minerales y antioxidantes que podrían ayudar en la prevención de diversas enfermedades degenerativas, reevaluó su decisión y empezó a consumirlo (King and Meiselman, 2010; Menezes *et al.*, 2011; Corrêa *et al.*, 2014; Siegrist *et al.*, 2015).

Los juicios de valor que orientan a un consumidor a preferir ciertos alimentos empiezan desde temprana edad y son inherentes a las preferencias de su madre durante el periodo de amamantamiento. En el caso de las frutas y las hortalizas es necesario que el fomento al consumo sea enfocado hacia la educación de las madres, con el fin de promover mejores hábitos de alimentación en los niños y futuros adultos (Forestell and Mennella, 2007). Se resaltan el color y los niveles de dulzor y acidez como unas características relevantes en el momento de elegir una fruta o una hortaliza:

- El color. Es de los elementos más decisivos al momento de evaluar y seleccionar un alimento. Las personas tienden a escoger alimentos que presenten colores más vívidos, ya que los oscuros o de poco brillo son asociados a procesos de descomposición o a la generación de afecciones adversas a la salud. Como ejemplo, Lee (Lee *et al.*, 2013) reporta que en las frutas generalmente los colores rojos intensos son preferidos, ya que se perciben como un indicador del grado de madurez, opuestos al color verde que tenían antes de madurar. Mientras que, en la mayor parte de las hortalizas, la preferencia se dirige hacia las tonalidades verde brillante, el desarrollo de colores amarillentos o marrones se oponen al grado de aceptación de las personas.

- El grado de acidez y dulzor. Se detectó que el grado de aceptación de naranjas, piñas y uvas era proporcional al contenido de sólidos solubles, a la relación sólidos solubles/acidez titulable y al pH. Todos estos parámetros fisicoquímicos contribuyen positivamente a su consumo, lo que evidencia que la población prefiere frutas más dulces y menos ácidas (Corrêa *et al.*, 2014).

En los países desarrollados, el consumo depende principalmente del ingreso económico. Por el contrario, en los países de menor desarrollo, el comportamiento del consumo depende principalmente del incremento de la población. La preferencia por productos cada vez más naturales, orgánicos, tradicionales, diferenciados en su envase (y/o empaque) y presentación y con características que contribuyan de forma específica y puntual a su salud, ha aumentado en los últimos años (CCI, 2007; Senior, 2007; CONPES 113, 2008; Fao and MinSalud, 2013).

- *Consumo de frutas y hortalizas en Colombia*

La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda un consumo mínimo de 400g entre frutas y verduras al día, con el objetivo de prevenir enfermedades no transmisibles y mantener una buena salud (MinSalud and ICBF, 1999; Zaldívar, 2003; Deloitte and Alimentacion, 2004; Hutado *et al.*, 2008; Fao and MinSalud, 2013; MinSalud, 2015a; Illescas, 2016).

En Colombia, entre las frutas que son más consumidas están: naranja, banano, fresa, manzana, piña, limón, mango, tomate de árbol, guayaba, maracuyá y papaya. El consumo mayoritario de frutas en el país se realiza en jugos y enteras. La mora es uno de los tres sabores más populares de jugo en Colombia. Por otra parte, las verduras que se consumen con mayor frecuencia son: tomate, cebolla de bulbo, zanahoria, cebolla de rama, arveja verde y habichuela (Sim *et al.*, 2001; ICBF *et al.*, 2010; Fao and MinSalud, 2013; Galindo Triana, 2015; ICBF, 2015).

Es difícil establecer un valor promedio para las cantidades consumidas de frutas y hortalizas, esto se debe a que varían de acuerdo con la edad, si la población es rural o urbana, la capacidad económica, entre otros. Por ello, en algunos casos se eliminan los datos extremos de en las distribuciones de consumo y se reporta el porcentaje de la población a la que corresponde. Por ejemplo, el 4% de la población consume 49,1 g/día

de ahuyama o un 18% 27,5 g/día de habichuela (cifras per cápita). Esto dificulta comparar los datos específicos para cada fruta u hortaliza (Fao and MinSalud, 2013; Galindo Triana, 2015)

Sin embargo, la Encuesta Nacional de Situación Nutricional (ENSIN) reporta una media de consumo diario de verduras fue de 62 gramos por el 76% de la población y la de frutas fue 88 gramos por el 63% de la población. Las principales razones para el bajo consumo de frutas y hortalizas, son, en orden de importancia: (1) el precio, (2) falta de tiempo (para su preparación), (3) la disponibilidad en los sitios habituales de compra, (4) la falta de costumbre y (5) el sabor. Por estas razones se puede decir que las frutas cuentan con una mayor aceptabilidad entre los consumidores (ICBF *et al.*, 2010; Fao and MinSalud, 2013; Galindo Triana, 2015). En el último informe de la encuesta (ENSIN 2015) se reporta un cambio alimentario en el país producido por diferentes factores (medioambientales, demográficos, de roles de género, de oferta social, político territoriales, en consumo y prácticas culinarias) que provoca una disminución en la ingesta de frutas y hortalizas (Fao and MinSalud, 2013; MinSalud, 2015b).

En conclusión, las frutas y hortalizas seleccionadas tienen indicadores de producción y comercialización que confirman la expectativa de crecimiento comercial. A pesar del crecimiento productivo, no se consumen en las cantidades recomendadas y pueden darse pérdidas por sobreproducción. El procesamiento de estos alimentos podría contribuir a evitar las pérdidas y a la vez proporcionar productos alternativos que permitan diversificar el consumo.

De acuerdo con los requerimientos observados para la fermentación láctica (revisados en el apartado 1.1.1), las características fisicoquímicas de las hortalizas pueden ser más compatibles con la viabilidad de las bacterias en comparación con las reportadas para las frutas (Tabla 3-1 y Tabla 3-6). Sin embargo, las frutas se consumen en una mayor cantidad al compararlas con las hortalizas, por lo que puede decirse que su aceptabilidad es mayor. Por lo tanto, las mezclas de una fruta con un vegetal pueden tener estas dos características: (1) compatibilidad para las bacterias lácticas y (2) mayor aceptabilidad. Debe considerarse que al realizar la mezcla también puede darse el efecto contrario, razón por la cual gana importancia la realización de ensayos experimentales.

5. Selección de mezclas

Se obtuvieron mezclas amarillas, rojas y verdes combinando una fruta con un vegetal, de acuerdo con lo especificado en el apartado 3.3.2. Se decidió mantener como referencia el color de las pulpas sin mezclar, propiedad que está asociada con la aceptabilidad. De esta manera se espera cumplir con la expectativa del consumidor. Se realizó una caracterización instrumental del color con el fin de identificar los cambios debidos a la mezcla.

Para identificar las mezclas con unas características más compatibles con la fermentación láctica se emplearon criterios técnicos de selección, que se detallan en el apartado 3.4.3. Para ello, se realizó la caracterización de algunas de las propiedades fisicoquímicas relacionadas con el crecimiento y mantenimiento microbiano (pH, acidez titulable, sólidos solubles y totales), de acuerdo con lo establecido en el apartado 3.2.1. Se seleccionaron estas variables pensando en que se pueden determinar de manera sencilla y pueden implementarse directamente por los productores.

Con los resultados obtenidos de esta caracterización se aplicó un método estadístico de ordenamiento de las diferentes mezclas agrupándolas de acuerdo con su color. Por lo tanto, para el experimento se consideraron como variables de estudio las proporciones de cada una de las pulpas (fruta u hortaliza) en la mezcla y como variables de respuesta, las propiedades fisicoquímicas de la mezcla resultante.

Cabe anotar que se presenta una amplia variabilidad de las propiedades fisicoquímicas debido a la naturaleza de las frutas y hortalizas. Algunos aspectos que pueden influir son la variedad (especie) del cultivo, los nutrientes o suplementos empleados para el crecimiento, el estado de madurez, las condiciones de cosecha y poscosecha. Para reducir este aspecto de variación se seleccionaron frutas y hortalizas de acuerdo con lo establecido en el apartado 3.1.1. Sin embargo, para el escalado podría considerarse una

estandarización de las propiedades de las mezclas, por ejemplo, mediante pequeñas variaciones en las proporciones de la fruta y hortaliza.

Posteriormente, se realizó una caracterización sensorial que permitió comprobar el mejoramiento de la aceptabilidad después de realizar la mezcla. Los mejores resultados se obtuvieron para la pulpa amarilla. Por esta razón, en este capítulo se presenta el detalle de la caracterización para las pulpas amarillas y los resultados más destacados de las pulpas rojas y verdes.

5.1 Caracterización de pulpas amarillas

Las pulpas de frutas y hortalizas fueron producidas utilizando el procedimiento detallado en la Figura 3.1 Para la obtención de las mezclas de pulpas amarillas se emplearon pulpas de zanahoria o ahuyama en combinación con una pulpa de fruta: uchuva, maracuyá o mango, en diferentes proporciones, tal como se detalló anteriormente en la Tabla 3-8.

5.1.1 Caracterización de las pulpas amarillas sin mezclar

Los resultados de la caracterización de las pulpas de frutas y hortalizas antes de mezcla se presentan en la Tabla 5-1.

Se observa una similitud en los valores de las coordenadas para las diferentes pulpas. Sin embargo, es posible dividir las en dos grupos de acuerdo con estos valores: (1) las pulpas de zanahoria, ahuyama y uchuva y (2) las pulpas de maracuyá y mango. Las primeras tienen mayores valores para la coordenada a^* (tendiendo al rojo) y menores valores de tonalidad (h^*).

Los valores de pH son cercanos a la neutralidad para las hortalizas e inferiores para las frutas y se encuentran en correspondencia con la acidez titulable. Se tienen valores altos de sólidos solubles y totales para las frutas, en comparación con los obtenidos para las hortalizas.

Tabla 5-1. Caracterización de pulpas amarillas sin mezclar.

Pulpa	Color				pH	Acidez titulable (meq. ácido/ g pulpa)	Sólidos solubles (°Brix)	Sólidos Totales (% p/p)
	L*	a*	b*	C*				
Zanahoria	L*	50.99			5.88	0.009	6.73	8.77
	a*	29.99	h*	66.69				
	b*	69.62	C*	75.80				
Ahuyama	L*	46.15			6.06	0.016	5.80	7.61
	a*	25.67	h*	69.86				
	b*	69.99	C*	74.55				
Uchuva	L*	51.47			3.93	0.234	14.13	15.78
	a*	24.73	h*	68.67				
	b*	63.33	C*	67.99				
Maracuyá	L*	47.26			3.21	0.687	14.30	16.72
	a*	18.55	h*	73.23				
	b*	61.56	C*	64.30				
Mango	L*	56.03			4.37	0.031	12.68	13.63
	a*	12.50	h*	79.51				
	b*	67.53	C*	68.68				

5.1.2 Caracterización del color de las mezclas amarillas

Se realizó la caracterización instrumental del color para las mezclas de uchuva con zanahoria y ahuyama (Figura 5.1).

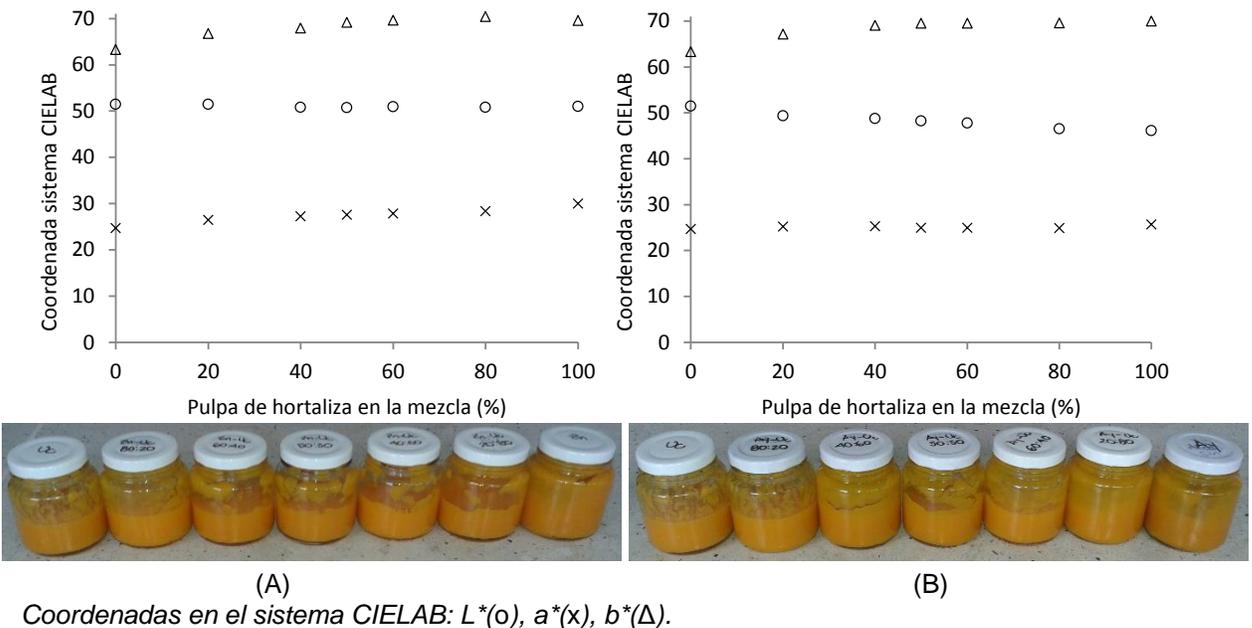
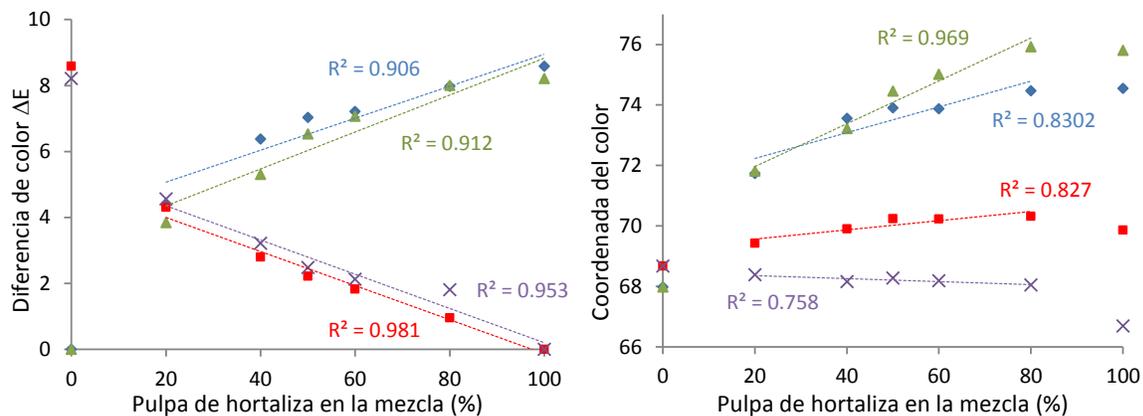


Figura 5.1: Color de mezclas de uchuva con (A) zanahoria y (B) ahuyama.

No se observa una diferencia importante para ninguna de las coordenadas, las cuales siguen una tendencia lineal, prácticamente horizontal y ligeramente proporcional a la cantidad de pulpa de hortaliza adicionada. Esto se debe a que el color de las pulpas de uchuva, zanahoria y ahuyama es similar. Sin embargo, se calcularon las diferencias absolutas (ΔE) en función del porcentaje de hortaliza en la mezcla, así como los cambios en la cromaticidad, cuyos resultados se presentan en la Figura 5.2.



(A)

ΔE mezclas con ahuyama: uchuva* (◆); ahuyama* (■).
 ΔE mezclas con zanahoria: uchuva* (▲); zanahoria* (×).

(B)

Mezcla uchuva - ahuyama C* (◆); h (■).
 Mezcla uchuva - zanahoria C* (▲); h (×).

Figura 5.2: (A) Diferencias de color en mezclas de uchuva (con ahuyama o zanahoria) y pulpas sin mezclar como referencia (*). (B) Color en mezclas de uchuva.

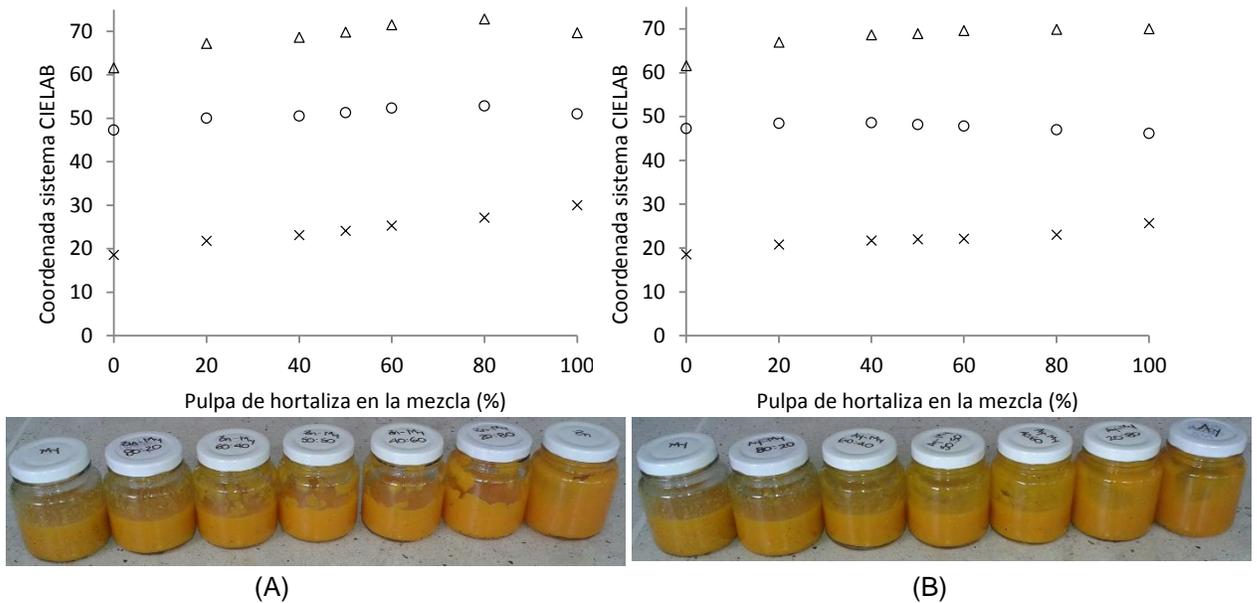
Se presentan tendencias lineales para todas las diferencias de color (Figura 5.2 (A)). Considerando la cercanía que tienen las rectas obtenidas para las mezclas con ahuyama o zanahoria, se puede decir que las diferencias de color no son relevantes.

Al tomar como referencia la pulpa de uchuva, las rectas tienen una pendiente positiva muy similar, mientras que al tener como referencia la pulpa de ahuyama o de zanahoria la pendiente es negativa. Esto quiere decir, que a medida que se adiciona pulpa de ahuyama o de zanahoria, el color de la mezcla se aleja del color de la uchuva. Adicionalmente, la tendencia lineal se extiende hasta las pulpas de las hortalizas, por lo que se puede decir que el color de la hortaliza (ya sea ahuyama o zanahoria) influye en mayor medida sobre el color de la mezcla.

Se observa una tendencia lineal para las coordenadas radiales (Figura 5.2 (B)) en todas las pulpas. Las pendientes para la saturación (o *chroma*, C^*) son positivas, por lo que su valor aumenta con la proporción de la pulpa de hortaliza en la mezcla. La pendiente para la tonalidad de la mezcla de uchuva con zanahoria es negativa y positiva cuando se emplea ahuyama, sin embargo, tienen valores bajos por lo que puede decirse que su cambio es poco relevante con la adición de las hortalizas. Los valores para la saturación y la tonalidad en la pulpa de uchuva son similares entre sí, mientras que para las pulpas de ahuyama y zanahoria difieren notablemente.

Por otra parte, la Figura 5.3 muestra los resultados de color para las mezclas de maracuyá con zanahoria y ahuyama. Se observa que el comportamiento para las coordenadas del color tiende a la linealidad, en especial si no se consideran las coordenadas para las pulpas de maracuyá, zanahoria y ahuyama (sin mezcla, 0% o 100%).

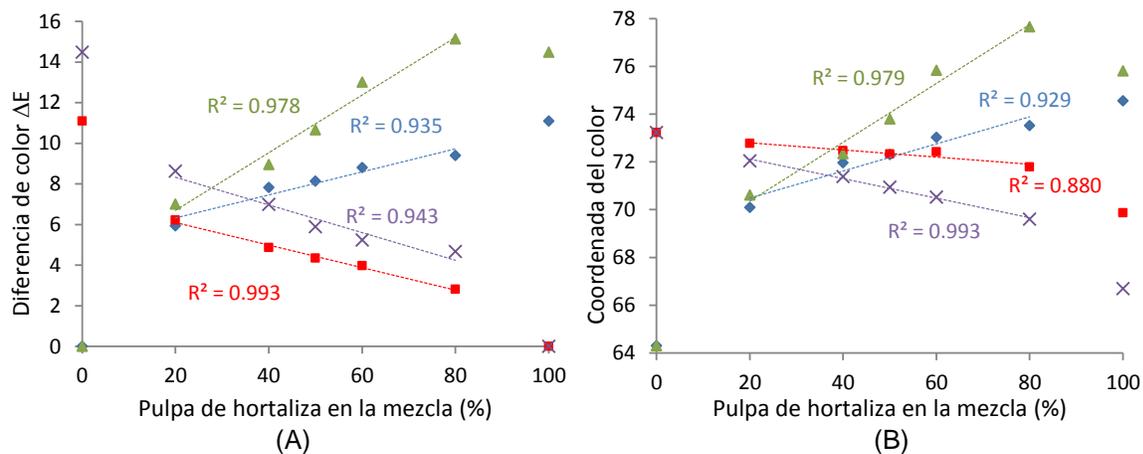
Esto quiere decir que, aunque el color de las mezclas está determinado por la combinación de las dos pulpas (fruta y hortaliza), pueden presentarse algunas interacciones entre los compuestos que proporcionan el color de las pulpas que no se encuentran en las pulpas puras.



Coordenadas en el sistema CIELAB: $L^*(o)$, $a^*(x)$, $b^*(\Delta)$.

Figura 5.3: Color en mezclas de maracuyá con (A) zanahoria y (B) y ahuyama.

Sin embargo, las pendientes no son muy marcadas; es decir, el comportamiento de las coordenadas tiende a ser horizontal, por lo que los cambios de color son menos perceptibles. Se calcularon las diferencias absolutas de color y las coordenadas radiales de color; los resultados se presentan en la Figura 5.4.



ΔE mezclas con ahuyama y: maracuyá (◆); ahuyama (■). Mezcla maracuyá - ahuyama C^* (◆); h (■).
 ΔE mezclas con zanahoria y: maracuyá (▲); zanahoria (×). Mezcla maracuyá - zanahoria C^* (▲); h (×).

Figura 5.4: (A) Diferencias de color en mezclas de maracuyá tomando como referencia las pulpas sin mezclar. (B) Propiedades del color en las mezclas de maracuyá.

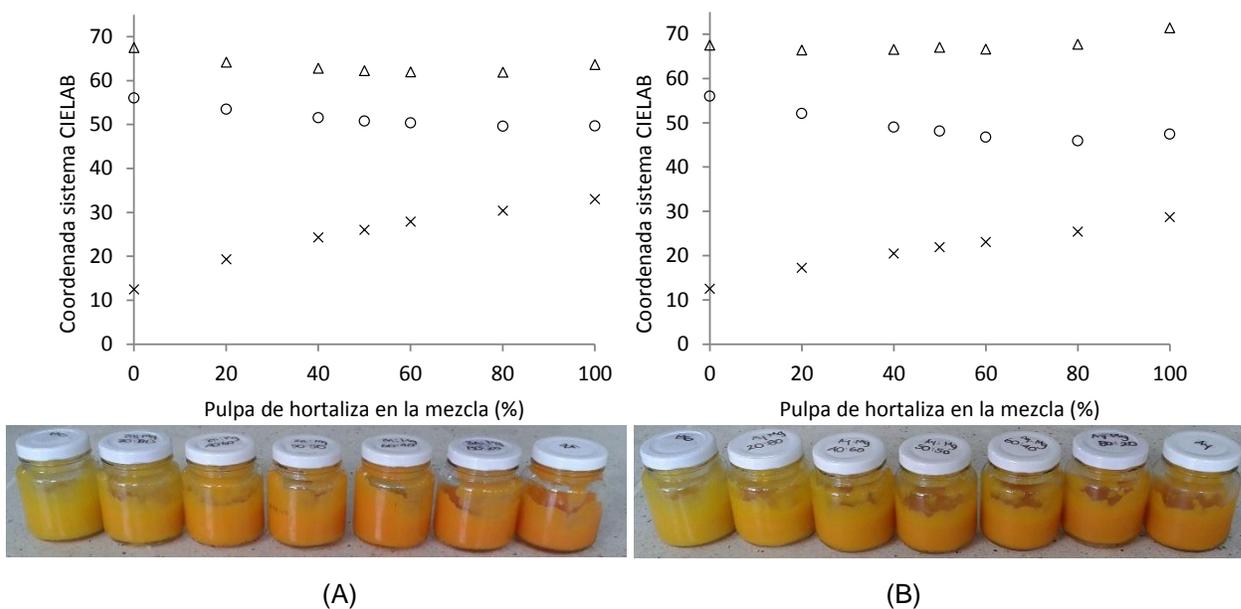
Al calcular las diferencias absolutas de color (Figura 5.4 (A)) en las mezclas de maracuyá puede observarse que son mayores a las encontradas para las mezclas de uchuva; es decir, para las pulpas de uchuva las diferencias máximas son cercanas a 9, mientras que para las pulpas de maracuyá estos máximos son mayores de 15.

Se evidencian pendientes positivas para las diferencias de color cuando se tiene como referencia la pulpa de maracuyá, por lo que al aumentar la proporción de hortaliza en la mezcla también lo hacen las diferencias de color. Cuando se toma como referencia la pulpa de hortaliza (ahuyama o zanahoria) el comportamiento es opuesto. Adicionalmente, se observa que las diferencias son mayores cuando se emplea zanahoria y no ahuyama en las mezclas.

En cuanto a las coordenadas radiales se observa una tendencia lineal, con pendientes positivas para la saturación (C^*) y negativas para la tonalidad (h). El valor para estas coordenadas en la pulpa de maracuyá difiere de forma importante entre sí, al igual que

para las pulpas de hortalizas (ahuyama y zanahoria), a diferencia de los casos anteriores (en uchuva y maracuyá, discutidas previamente). Se destaca que la saturación para la mezcla de maracuyá y zanahoria en proporciones mayores del 80% es superior a la de la zanahoria y puede verse el mismo comportamiento para la coordenada b^* (ver Figura 5.3), lo cual indica que la adición de maracuyá a la pulpa de zanahoria hace que aumente su tonalidad amarilla.

También se realizó la determinación de color para las mezclas de mango con ahuyama y zanahoria, cuyos resultados se muestran en la Figura 5.5. Se observan tendencias lineales para las mezclas, en todas las coordenadas, y a diferencia de los casos anteriores (para las mezclas obtenidas a partir de uchuva y maracuyá), las pendientes son mayores.



Coordenadas en el sistema CIELAB: $L^*(o)$, $a^*(x)$, $b^*(\Delta)$.

Figura 5.5: Color en mezcla de mango con (A) zanahoria y (B) y ahuyama.

Esto indica que los cambios producidos en el color del mango al adicionar pulpas de zanahoria o ahuyama son mayores en comparación con los que se obtienen para las mezclas de uchuva y maracuyá. Esta diferencia es más evidente para la coordenada a^* , lo cual demuestra que la tonalidad roja en las mezclas con mango en mayor medida que se adiciona la pulpa de hortaliza (ahuyama o zanahoria).

A partir de estos resultados se calcularon las diferencias de color (ΔE) y las coordenadas radiales que se presentan en la Figura 5.6. En todos los casos se evidencian tendencias lineales para las diferencias absolutas de color (A) que pueden incluir los valores calculados para las pulpas de ahuyama y zanahoria (100%).

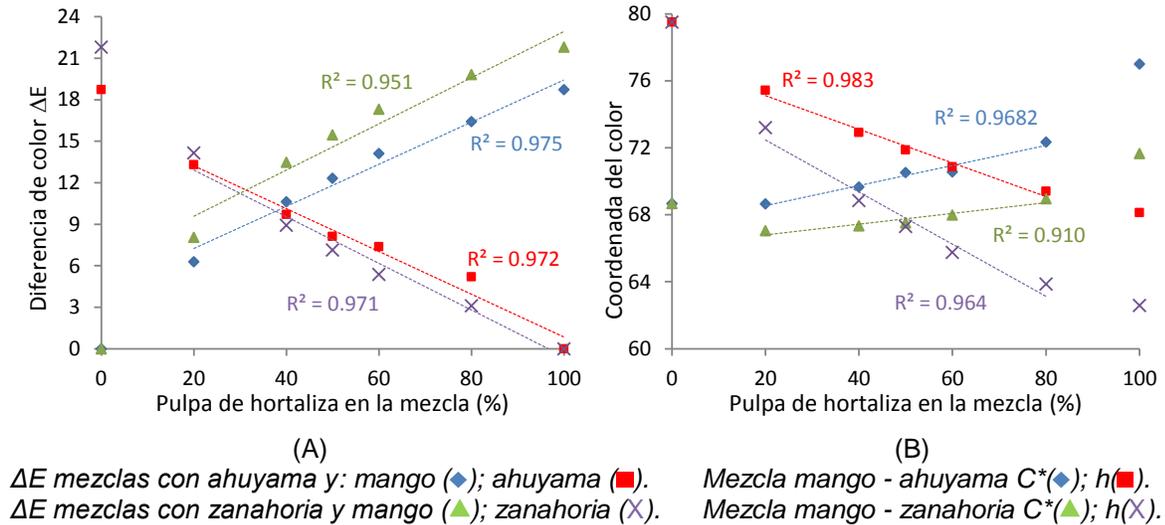


Figura 5.6: (A) Diferencias de color en mezclas de mango tomando como referencia las pulpas sin mezclar. (B) Propiedades del color en las mezclas de mango.

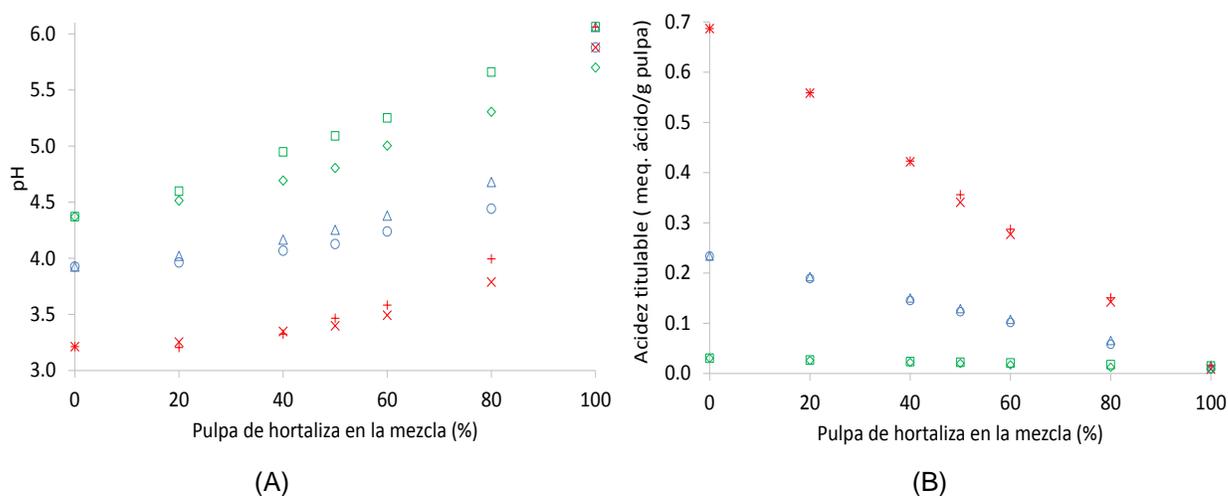
Al igual que para las pulpas de uchuva, las diferencias en relación con las pulpas de zanahoria y ahuyama no son considerables. Sin embargo, al considerar las diferencias con la pulpa de mango, se encuentra que para las mezclas con zanahoria las diferencias son mayores que para las mezclas con ahuyama.

Los cambios en la cromaticidad (Figura 5.6 (B)) presentan tendencias lineales únicamente para las mezclas sin incluir las pulpas puras (mango, ahuyama o zanahoria). Tanto para la saturación (C^*) como para la tonalidad (h) se observan valores mayores para las mezclas con ahuyama. Al igual que para el caso de las pulpas de maracuyá, los valores para las dos propiedades son distantes entre sí, al igual que para las pulpas de ahuyama y zanahoria.

5.1.3 Caracterización de pH y acidez titulable de mezclas amarillas

Al mezclar pulpas de frutas y hortalizas es posible que se presenten interacciones entre los compuestos de cada una de ellas. Las principales variaciones que se pueden observar en la caracterización de las pulpas (pH, acidez titulable, sólidos solubles y totales) están relacionadas con la composición de ácidos orgánicos y carbohidratos. Si no se presenta ninguna interacción, se espera un comportamiento lineal para estas propiedades; es decir, el cambio en las características de la pulpa de fruta debe ser proporcional a la cantidad de pulpa de hortaliza adicionada. También se espera linealidad para la concentración de (H^+) en la solución, pero no para los valores de pH.

En la Figura 5.7 se muestran los resultados de pH y acidez titulable de las pulpas amarillas (uchuva, maracuyá o mango con zanahoria o ahuyama).



Mezclas: Uchuva – Zanahoria (○), Uchuva – Ahuyama (△), Mango – Zanahoria (◇), Mango – Ahuyama (□), Maracuyá – Zanahoria (×) y Maracuyá – Ahuyama (+).

Figura 5.7: (A) pH y (B) acidez titulable de mezclas amarillas.

Para el pH de las mezclas con uchuva y maracuyá se presentan tendencias no lineales, por lo que para obtener cambios relevantes para esta propiedad, la proporción de la hortaliza en la mezcla debe ser alta. Sin embargo, a diferencia de lo encontrado para las otras mezclas, para la mezcla de mango y ahuyama se tiene un comportamiento lineal ($R^2=0.991$).

Adicionalmente, para la misma proporción de hortaliza en la pulpa, si el pH de la fruta es muy bajo (como es el caso del maracuyá), el cambio en el pH será menor. Por ejemplo, al tener una proporción de pulpa de hortaliza del 60% el pH de la mezcla con maracuyá aumenta un 12.5% (de 3.2 a 3.6), mientras que para la mezcla con mango el pH cambia un 18.2% (de 4.4 a 5.2). Desde otro punto de vista, el pH de la pulpa de ahuyama o zanahoria disminuye rápidamente con adiciones pequeñas de pulpas de fruta. Estas diferencias pueden influenciar de forma importante la viabilidad de las bacterias lácticas.

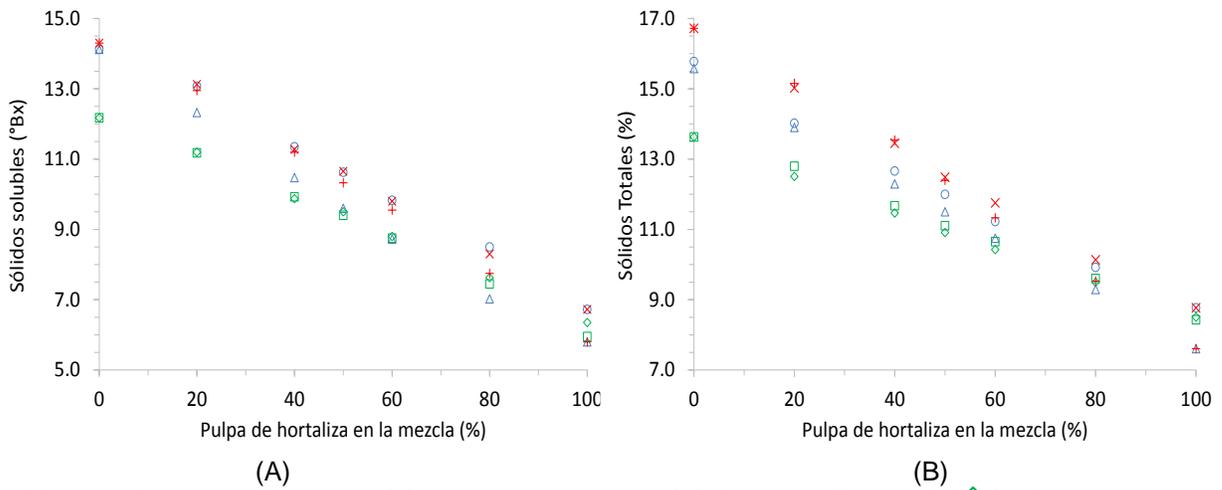
Aunque se tienen valores de pH mayores cuando se emplea ahuyama, estas diferencias no son considerables, en especial con pulpa de maracuyá. Las principales diferencias se deben a la fruta, por lo que se tienen mayores valores de pH para las mezclas con mango, uchuva y maracuyá, respectivamente.

Con relación al comportamiento encontrado para la acidez titulable, se tienen tendencias lineales y proporcionales a la cantidad de hortaliza (ahuyama o zanahoria), con pendientes negativas. No se presentan diferencias si se emplea pulpa de ahuyama o zanahoria. Las principales diferencias se deben a la fruta, por lo que se observan mayores valores para la acidez de las mezclas con maracuyá que para las mezclas con uchuva o mango. Debido a que la acidez titulable del mango es similar a la de las pulpas de zanahoria y ahuyama, el comportamiento de la acidez para las mezclas es prácticamente constante y horizontal; es decir, la adición de pulpa de hortaliza (zanahoria o ahuyama) no afecta notablemente la acidez titulable del mango.

5.1.4 Caracterización de sólidos solubles y totales de mezclas amarillas

En la Figura 5.8 se presenta los sólidos solubles y los sólidos totales frente al porcentaje de hortaliza, en las pulpas amarillas. Las dos propiedades tienden a la linealidad y son inversamente proporcionales a la cantidad de hortaliza en la mezcla. Los valores en las dos propiedades son mayores para las frutas que para las hortalizas, por lo que la pendiente es negativa en todos los casos. Las principales diferencias se deben a las frutas empleadas, ya que el comportamiento de la ahuyama y de la zanahoria es similar.

En especial cuando se emplea mango, en cuyo caso se obtienen valores inferiores. La diferencia no es relevante entre las mezclas con uchuva o con maracuyá.



Mezclas: Uchuva – Zanahoria (○), Uchuva – Ahuyama (△), Mango – Zanahoria (◇), Mango – Ahuyama (□), Maracuyá – Zanahoria (×) y Maracuyá – Ahuyama (+).

Figura 5.8: (A) Sólidos solubles y (B) y sólidos totales de mezclas amarillas.

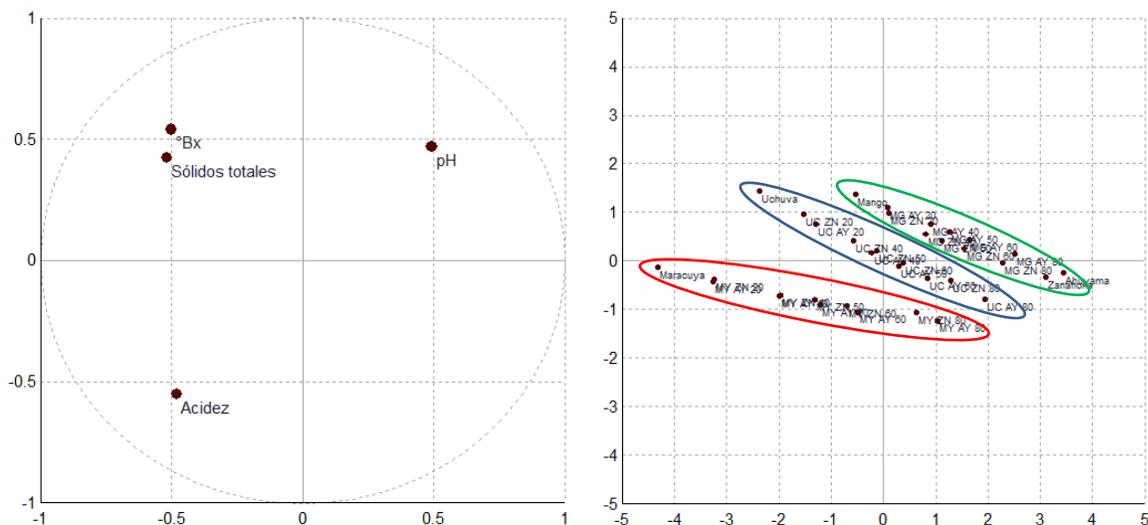
Considerando que las figuras obtenidas para el comportamiento de sólidos solubles y totales son similares entre sí, puede decirse que para las pulpas amarillas la mayoría de los sólidos totales son solubles y no hay una influencia importante de otras sustancias solubles como: fibras, ácidos, pectinas, entre otros.

Cabe destacar que las sustancias solubles en el sustrato se encuentran más disponibles para el aprovechamiento de los microorganismos, por lo que el potencial para la fermentación es mayor al aumentar los sólidos solubles. A pesar de que la influencia de los sólidos totales es menor, también tiene efecto sobre el potencial fermentativo.

5.1.5 Análisis estadístico de resultados de caracterización para la selección de mezclas amarillas

En la Figura 5.9 se presenta el análisis por componentes principales realizado a partir de los datos de caracterización para las pulpas amarillas. Este análisis permite describir el comportamiento de las variables de respuesta (pH, acidez titulable, sólidos solubles y totales) a través de los dos primeros componentes principales, los cuales explican un 96% de la varianza total.

De acuerdo con el primer componente principal (eje X), la variable que tiene mayor influencia sobre las propiedades de la mezcla es la acidez titulable, mientras que para el segundo componente (eje Y) intervienen por igual la acidez titulable, los sólidos solubles y totales. Tanto los sólidos solubles como los totales se encuentran en el segundo cuadrante de la gráfica, lo cual indica que para las mezclas amarillas estas variables están correlacionadas entre sí.



Mezclas con: Uchuva (---); mango (---); maracuyá (---)

Figura 5.9: Análisis por componentes principales de la caracterización de mezclas amarillas

Se observan tres grupos determinados por la fruta presente en la mezcla (uchuva, maracuyá o mango), lo cual es consistente con los resultados obtenidos tanto para pH como acidez.

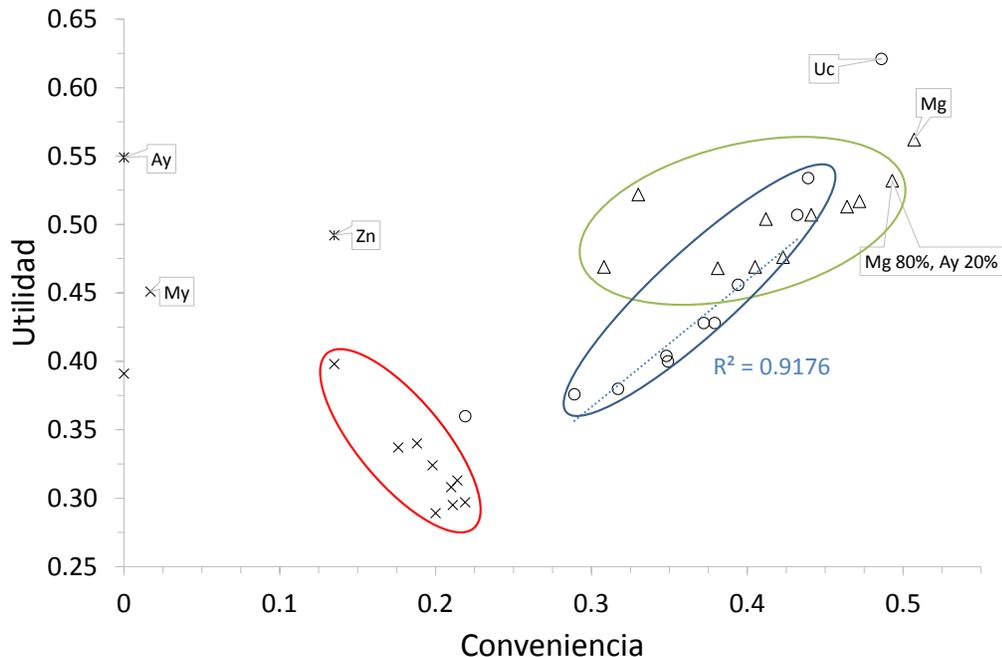
Este comportamiento permite establecer que, para las variables de respuesta, el efecto que tiene la fruta sobre las propiedades de la mezcla es mayor que el proporcionado por la hortaliza. Por esta razón, se observa que a medida que aumenta la cantidad de fruta en la mezcla las características de ésta se alejan de las registradas para las pulpas de hortaliza (ahuyama o zanahoria).

Adicionalmente, solo para las mezclas realizadas con la pulpa de mango su comportamiento permite incluir las pulpas de ahuyama y zanahoria sin alterar la

tendencia establecida previamente. Esto confirma la afinidad de la pulpa de mango con las pulpas de hortalizas, que se observó en el análisis de los resultados discutidos anteriormente.

Se resalta que el grupo de mezclas con pulpa de mango está centrado en los ejes de los componentes principales, lo cual indica que tanto el pH como la acidez de estas mezclas pueden influir en la misma proporción en el crecimiento bacteriano.

La Figura 5.10 presenta los resultados obtenidos en el análisis estadístico para los datos de caracterización de las pulpas amarillas al aplicar el modelo de utilidad en función de la conveniencia.



Ay: pulpa de ahuyama. Mg: pulpa de mango. My: pulpa de maracuyá. Uc: pulpa de uchuva. Zn: pulpa de zanahoria. Mezclas: Uchuva – Ahuyama o zanahoria (●), Mango – Ahuyama o zanahoria (▲), Maracuyá – Ahuyama o zanahoria (■).

Figura 5.10: Análisis de utilidad y conveniencia en la caracterización de mezclas amarillas

Estos resultados son consistentes con los reportados en el análisis por componentes principales. Se observan tendencias que permiten agrupar los resultados de acuerdo con la fruta empleada para la mezcla (maracuyá, uchuva y mango). Por lo tanto, las mezclas

obtenidas a partir de pulpas de zanahoria o ahuyama no son significativamente diferentes. Sin embargo, al comparar la pulpa de ahuyama (100%) con la de zanahoria (100%) se presenta una diferencia relevante: la primera es más conveniente y la segunda más útil.

En general, las pulpas con menores resultados de conveniencia y utilidad son las obtenidas a partir de la pulpa de maracuyá, mientras que las pulpas obtenidas a partir de uchuva y mango se entrecruzan, especialmente al aumentar el contenido de la pulpa de hortalizas, teniendo mayores valores de utilidad para las pulpas de mango. Para la pulpa de uchuva los resultados muestran una tendencia lineal definida ($R^2 = 0.917$), incluso con los resultados de las mezclas de las dos hortalizas (zanahoria y ahuyama), mientras que para las mezclas de pulpas de maracuyá y mango no se reporta una tendencia definida.

Para las pulpas puras se presentan altos valores de conveniencia y utilidad para las frutas de uchuva (teniendo un máximo para la utilidad) y mango (con un máximo para la conveniencia) frente a los valores reportados para las pulpas de ahuyama, zanahoria y maracuyá. Por lo tanto, al adicionar pulpa de mango a la pulpa de ahuyama el valor de la conveniencia aumenta, pero el de la utilidad disminuye. Esta tendencia continúa al aumentar la proporción de pulpa de hortaliza en la mezcla.

En conclusión y de acuerdo con la evaluación del potencial fermentativo realizada previamente con los resultados de las caracterizaciones, se seleccionó la mezcla de mango (80%) y ahuyama (20%) para la evaluación experimental de la fermentación. Se espera que sus características favorezcan tanto el crecimiento como el mantenimiento bacteriano.

5.2 Caracterización de pulpas rojas

Las pulpas sin mezclas fueron obtenidas empleando el procedimiento que se detalló en la Figura 3.1. Las pulpas rojas se obtuvieron a partir de la mezcla de pulpa de remolacha con pulpas de tres frutas: guayaba, fresa o mora, en diferentes proporciones (ver Tabla 3-8). Las caracterizaciones se realizaron de acuerdo con los métodos establecidos en el apartado 3.2.1. El detalle de las caracterizaciones realizadas puede consultarse en el

ANEXO C; en el presente apartado se muestran los principales hallazgos y las conclusiones obtenidas a partir de los mismos.

5.2.1 Caracterización de las pulpas rojas sin mezclar

Los resultados de la caracterización de estas pulpas en las propiedades fisicoquímicas empleadas como variables de respuesta se presentan en la Tabla 5-2.

Tabla 5-2. Caracterización de pulpas de remolacha, guayaba, fresa y mora sin mezclar.

Pulpa	Color				pH	Acidez titulable (meq. ácido/ g pulpa)	Sólidos solubles (°Brix)	Sólidos Totales (% p/p)
	L*	a*	b*	C*				
Remolacha	L*	4.86			6.17	0.021	7.45	8.51
	a*	21.18	h*	11.61				
	b*	4.35	C*	21.62				
Guayaba	L*	47.77			4.18	0.067	6.28	12.06
	a*	28.20	h*	35.45				
	b*	20.08	C*	34.62				
Fresa	L*	41.63			3.64	0.240	8.13	10.55
	a*	27.60	h*	32.93				
	b*	17.88	C*	32.89				
Mora	L*	21.06			3.39	0.331	7.43	9.12
	a*	36.04	h*	20.97				
	b*	13.81	C*	38.59				

En general, para la determinación instrumental del color puede verse: (1) valores similares para las diferentes coordenadas en las pulpas de guayaba y fresa; (2) las diferencias más notorias se observan en la remolacha (bajo valor para b^*) y la mora (alto valor para a^*); los valores de tonalidad (h^*) y cromaticidad (C^*) en la guayaba y la fresa también son similares entre sí. Estos resultados se tuvieron en cuenta para la evaluación posterior de las mezclas entre pulpas de fruta y hortaliza.

Se observan valores de pH bajos para las frutas y alto para la remolacha, mientras que los valores para la acidez titulable es mayor para la fresa y la mora. Los valores para los sólidos solubles y los totales son mayores para la fresa y similares en la remolacha y la mora. A pesar de que en la guayaba se tiene el mayor valor de sólidos totales, se tiene el menor valor de sólidos solubles.

5.2.2 Caracterización del color en las mezclas rojas

Teniendo en cuenta las similitudes en el color se las pulpas de guayaba y fresa, el comportamiento del color en estas dos mezclas es similar. La principal diferencia se presenta en la coordenada L^* , mostrando una mayor luminosidad en la pulpa de guayaba. En los dos casos el comportamiento con respecto a la proporción de pulpa de remolacha es lineal. Puede decirse que esta hortaliza tiene una mayor influencia sobre el color de la mezcla, y que una pequeña adición de su pulpa puede modificar considerablemente el color de la mezcla. Al calcular las diferencias absolutas de color (ΔE) de cada una de las mezclas, tomando como referencia la pulpa de fruta (fresa o guayaba) o de remolacha, la tendencia es lineal.

Para la pulpa de mora el comportamiento del color para las tres coordenadas tiende a la linealidad. La influencia de la adición de pulpa de remolacha sobre del color de las mezclas no es tan determinante en comparación con el obtenido en las mezclas con guayaba o fresa, ya que para la pulpa de mora la luminosidad (L^*) es menor y su color rojo es mayor (mayor valor para la coordenada cromática a^* , rojo/verde). En este caso también se encontraron tendencias lineales a partir del cálculo de las diferencias absolutas de color.

5.2.3 Caracterización de pH y acidez titulable de las mezclas rojas

En la Figura 5.11 se reportan los resultados de pH y acidez titulable para pulpas rojas en función de la proporción de remolacha en la mezcla. La tendencia del pH no es lineal, por lo que se requiere adicionar una gran cantidad de pulpa de remolacha para alcanzar cambios relevantes en el pH de la mezcla. Por ejemplo, en la pulpa de guayaba la mezcla debe tener una composición del 60% de pulpa de remolacha para pasar de un pH de 4,2 a 4,7. Desde otro punto de vista, el pH de la pulpa de remolacha cambia de 6,2 a 5,1 al adicionarle el 20% de pulpa de guayaba.

Este resultado corresponde con el comportamiento lineal de la acidez titulable, e indica que las especies ácidas presentes en las pulpas son inversamente proporcionales a la cantidad de remolacha adicionada. Puede decirse que no se han presentado reacciones químicas ni alteraciones entre los compuestos que afecten el equilibrio propio de los

ácidos orgánicos presentes. Se resalta que cuando la acidez de la fruta es mayor, la pendiente de la recta que describe el comportamiento de la mezcla también es mayor. Por lo tanto, se requiere una mayor cantidad de pulpa de remolacha para modificar el pH de la mezcla; es decir, al adicionar la misma cantidad de pulpa de remolacha en la mezcla, el pH de la mora aumenta menos que el pH de la fresa o de la guayaba.

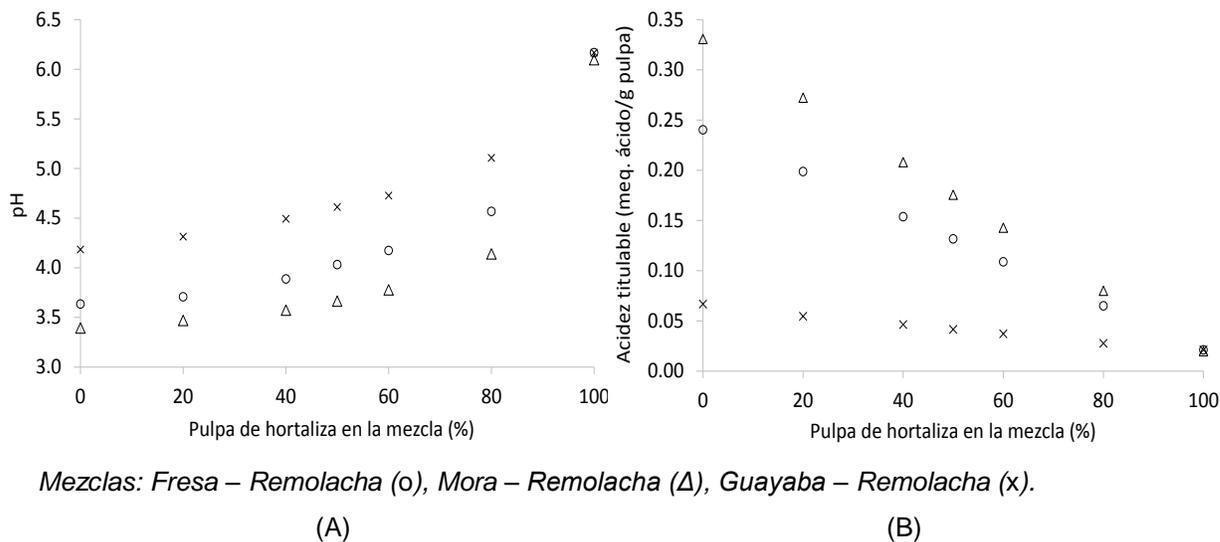


Figura 5.11: (A) pH y (B) acidez titulable de mezclas de pulpas rojas.

5.2.4 Caracterización de sólidos solubles y totales de mezclas rojas

Se presentaron tendencias lineales para los resultados de sólidos solubles y totales en las mezclas. Para los sólidos solubles la pendiente fue positiva en la guayaba y negativa en fresa y mora. Los sólidos totales tuvieron pendientes negativas para todas las mezclas. Por lo tanto, una mayor cantidad de sólidos totales no implica mayores valores de sólidos solubles. Por ejemplo, las mezclas con guayaba tienen una mayor cantidad de sólidos totales y una menor cantidad de sólidos solubles, respecto a las de fresa y mora. Esto se debe a que al determinar la cantidad de sólidos totales también se incluyen todos los componentes de la pulpa (fibras, proteínas, ácidos, pectinas, etc.) incluyendo insolubles.

5.2.5 Análisis estadístico de los resultados de caracterización y selección de pulpas rojas

En la Figura 5.12 se presenta el análisis por componentes principales realizado a partir de los resultados de caracterización fisicoquímica de las pulpas rojas. Este análisis describe la información aportada por los resultados mediante la reducción de dimensiones, a través de los componentes principales que explican un 89% de la varianza total.

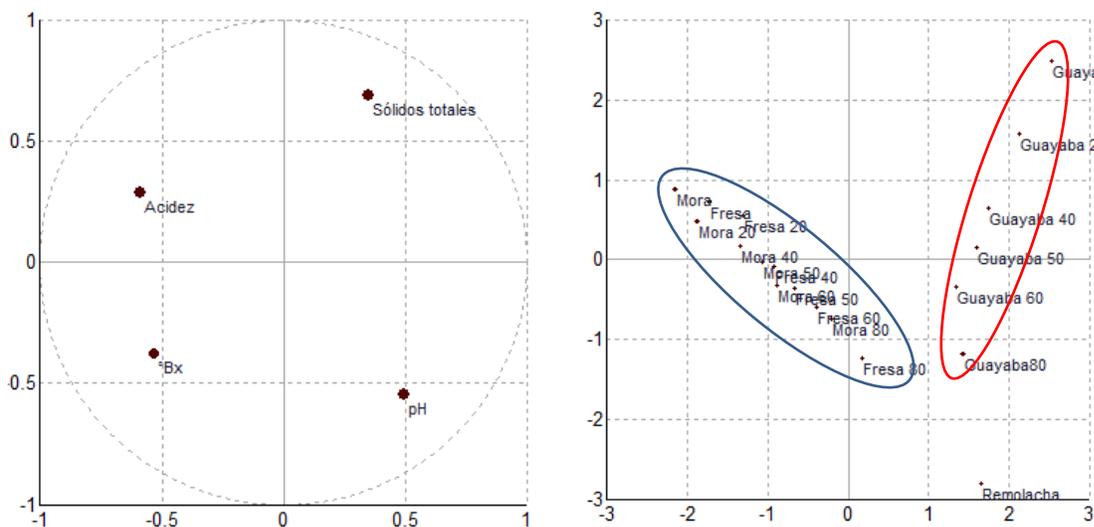


Figura 5.12: Análisis por componentes principales de la caracterización de mezclas rojas

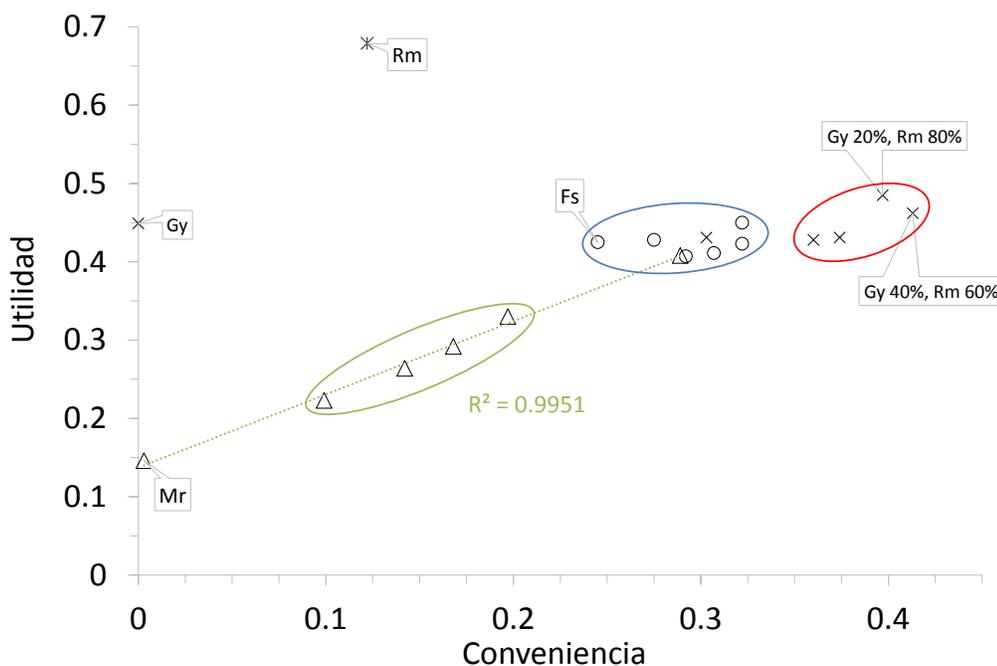
Teniendo en cuenta que los componentes principales son combinaciones lineales de las variables de respuesta (pH, acidez, sólidos solubles y totales), las variables que más influyen sobre el cálculo del primer componente (eje x) son el pH y los sólidos solubles, mientras que para el segundo componente (eje y) son los sólidos solubles y la acidez titulable.

A diferencia de lo observado para las pulpas amarillas los sólidos solubles y totales se encuentran en cuadrantes diferentes, resultado que corresponde con los resultados anteriormente discutidos.

A partir del análisis las mezclas rojas se pueden separar en dos grupos: uno para las mezclas con fresa y mora y otro para las mezclas con guayaba. Esto demuestra que para las propiedades fisicoquímicas de las mezclas el efecto que tiene la adición de pulpas de

fresa o mora sobre la pulpa de remolacha es similar y difiere cuando se usa guayaba. Esta diferencia se debe principalmente a los altos valores de acidez o de sólidos totales. En las mezclas con guayaba puede verse que a medida que aumenta el contenido de pulpa de remolacha las variables siguen una tendencia casi lineal.

Los resultados obtenidos en el análisis estadístico empleando modelos de utilidad en función de la conveniencia para los datos de caracterización de las pulpas rojas se reportan en la Figura 5.13.



Fs: pulpa de fresa. Mr: pulpa de mora. Gy: pulpa de guayaba. Rm: pulpa de remolacha. Mezclas: Fresa – Remolacha (o), Mora – Remolacha (Δ), Guayaba – Remolacha (x).

Figura 5.13: Análisis de utilidad y conveniencia a partir de la caracterización de mezclas rojas.

A diferencia de lo que ocurre al hacer el tratamiento estadístico por componentes principales, en donde los resultados para las mezclas de fresa y mora son similares, en el análisis realizado por conveniencia y utilidad se tienen tres grupos de acuerdo con la fruta con la que se realiza en la mezcla. Este comportamiento se obtiene al considerar de una forma simultánea la influencia de los sólidos totales y del pH sobre el potencial fermentativo (de acuerdo con la ponderación que se detalló en la Tabla 3-9), propiedades que, a su vez, son las mayores responsables de las diferencias presentadas de acuerdo con el análisis de componentes principales.

De esta manera puede estudiarse de una forma gráfica la influencia que tiene la adición de la pulpa de remolacha sobre el potencial fermentativo de las mezclas (que aumenta al tener mayores valores de conveniencia y utilidad). Es así, que puede observarse, por ejemplo, cómo aumenta la conveniencia de la pulpa de mora con la adición de pulpa de remolacha, en una tendencia lineal con un alto índice de correlación.

Sin embargo, esta tendencia no está definida para las mezclas realizadas con fresa y guayaba. El análisis simultáneo de las propiedades valoradas hace más evidente la separación que se presenta entre el comportamiento de las pulpas puras (especialmente de guayaba, mora y remolacha) y las mezclas.

De acuerdo con los criterios de ponderación establecidos se resalta el comportamiento de las pulpas obtenidas a partir de guayaba y remolacha en diferentes proporciones que presentan un mayor potencial para la fermentación láctica frente a las mezclas realizadas con fresa y mora, al tener mayores valores de conveniencia y utilidad.

Tal como se presenta en la Figura 5.13, las pulpas puras de remolacha (Rm 100%) y guayaba (Gy 100%), presentan los mayores valores para la utilidad, pero valores bajos de conveniencia. Al realizar la mezcla la conveniencia aumenta significativamente: se observa que al adicionar pulpa de guayaba (20%) a la pulpa de remolacha (80%) se obtiene un aumento en la conveniencia y un máximo para la utilidad; al aumentar la proporción de pulpa de guayaba (40%) en la mezcla, el valor de utilidad disminuye y el de conveniencia es máximo. Frente a este beneficio, la reducción de la utilidad es despreciable a pesar de llegar a un nivel similar del que tiene la pulpa de guayaba pura (100%).

En conclusión y considerando los resultados obtenidos en la evaluación del potencial fermentativo para las pulpas rojas, se seleccionó la mezcla con una proporción de 40% de pulpa de guayaba y 60% de pulpa de remolacha para evaluar experimentalmente la fermentación empleando bacterias lácticas, ya que se consideró que posee características más favorables para el crecimiento bacteriano.

5.3 Caracterización de pulpas verdes

Las pulpas verdes sin mezclar se obtuvieron empleando los procedimientos detallados en el apartado 3.2.1. A partir de la mezcla de pulpas de hortalizas (espinaca o guatila) con una pulpa de fruta (lulo o feijoa), en diferentes proporciones (especificadas en la Tabla 3-8). El detalle de las caracterizaciones realizadas puede consultarse en el ANEXO C; en el presente apartado se muestran los principales hallazgos y conclusiones.

5.3.1 Caracterización de las pulpas verdes sin mezclar

Los resultados de la caracterización de las pulpas antes de la mezcla se presentan en la Tabla 5-3. A pesar de que todas las pulpas están en la gama de los verdes, se observan diferencias importantes en todas las coordenadas de color. Las pulpas de las hortalizas presentan el color más similar, siendo la luminosidad (L^*) la coordenada que marca la diferencia.

En cuanto a las propiedades fisicoquímicas se observan valores neutros para las hortalizas acompañados de una baja acidez titulable, mientras que en las frutas los valores bajos de pH están acompañados de altos valores de acidez. Se tienen bajos valores de sólidos solubles, a pesar de que en las frutas los sólidos totales son altos.

Tabla 5-3. Caracterización de pulpas de espinaca, guatila, lulo y feijoa sin mezclar.

Pulpa	Color				pH	Acidez titulable (meq. ácido/ g pulpa)	Sólidos solubles (°Brix)	Sólidos Totales (% p/p)
	L*							
Espinaca	L*	22.88			6.53	0.017	3.08	7.21
	a*	-7.78	h*	-73.65				
	b*	26.51	C*	27.63				
Guatila	L*	53.41			6.09	0.012	4.98	7.40
	a*	-6.90	h*	-76.89				
	b*	29.60	C*	30.40				
Lulo	L*	49.49			3.49	0.392	8.05	10.74
	a*	10.67	h*	78.51				
	b*	52.50	C*	53.57				
Feijoa	L*	51.19			3.42	0.333	3.42	17.61
	a*	0.61	h*	88.84				
	b*	30.21	C*	30.21				

5.3.2 Caracterización del color de las mezclas verdes

La determinación instrumental de color se realizó inicialmente para las mezclas obtenidas a partir de espinaca con feijoa o lulo. Durante el ensayo experimental se observó un cambio considerable en el color de las mezclas, pasando de verde a marrón.

Debido a esta diferencia, la caracterización instrumental de color se realizó en dos momentos ($t = 0h$ y $t = 3h$), para establecer si se presentaban o no cambios relevantes en las coordenadas L^* , a^* , b^* . La diferencia principal se encontró en la coordenada a^* , que va del rojo al verde, obteniendo mayores valores luego de obtener la mezcla, ya sea con feijoa o con lulo. Para la luminosidad (L^*) y para la coordenada b^* se presentaron tendencias lineales inversamente proporcionales a la cantidad de espinaca en la mezcla, en especial si se descartan los valores para las pulpas de frutas puras (feijoa o lulo).

Se calcularon las diferencias absolutas de color entre las muestras considerando los cambios presentados. En todos los casos se observaron tendencias lineales. Al tomar como referencia el color de la espinaca, las pendientes son positivas. En concordancia, al tomar como referencia la fruta, las pendientes son negativas.

Se calcularon las diferencias de color debidas al tiempo transcurrido luego de mezcla en función de la cantidad de pulpa de hortaliza, encontrando un comportamiento parabólico con un máximo cercano a 8 en las mezclas con 60% de pulpa de espinaca.

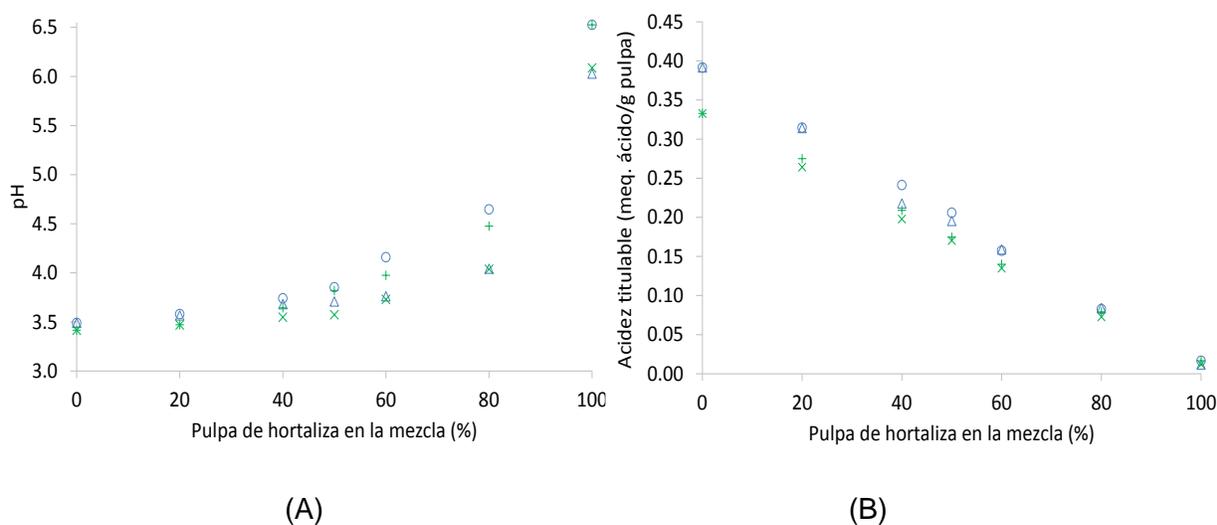
Esta degradación del color se debe principalmente a la inestabilidad que tiene la clorofila frente a los tratamientos térmicos y los cambios de pH, en especial el descenso en el pH ocasionado por la mezcla con pulpas de frutas ácidas (lulo y/o feijoa). En la Figura 5.14 se detallan los principales cambios de coloración que sufren las clorofilas, ya sea por la acidificación del medio en el que se encuentran o por acción enzimática.

Durante el calentamiento puede alterarse la estructura de la clorofila mediante la pérdida del Mg^{2+} del centro de la molécula, haciendo que el espectro de absorción cambie de 428nm a 408nm, lo cual produce el cambio de color verde a marrón. La estructura celular se modifica liberando la clorofila que se encuentra en las granas de los cloroplastos de la planta, la permeabilidad de la membrana del citoplasma aumenta y permite la liberación

Para estas pulpas también se calcularon las diferencias absolutas de color, observando tendencias lineales en todos los casos, con pendientes negativas cuando se toma como referencia la guatila y positivas cuando la referencia es la fruta (lulo o feijoa). Las diferencias son mayores para las mezclas con lulo que con feijoa, incluso al tomar como referencia la guatila, la tendencia prácticamente es horizontal. Por lo tanto, puede decirse que la pulpa de fruta influye más sobre el color de la mezcla que la pulpa de guatila.

5.3.3 Caracterización de pH y acidez titulable de mezclas verdes

Se realizó la caracterización de pH y acidez titulable en las pulpas verdes. Los resultados se presentan en la Figura 5.15. La tendencia para el pH se aleja de la linealidad, a medida que la proporción de pulpa de hortaliza (guatila o espinaca) aumenta en la mezcla el cambio en el pH es muy pequeño; es decir, una adición del 80% de pulpa de hortaliza cambia el pH de 3,5 a menos de 4,5.



Mezclas: Lulo – Espinaca (o), Lulo - Guatila (Δ), Feijoa - Guatila (x), Feijoa – Espinaca (+).

Figura 5.15: (A) pH y (B) acidez titulable de mezclas verdes.

Al emplear proporciones bajas de pulpa de hortalizas (menores de 50%) no se observa una diferencia importante al emplear guatila o espinaca, ya que el pH de las frutas es similar, si aumenta esta proporción la también lo hace la diferencia. Por lo tanto, a pesar de que las pequeñas diferencias se deben a la hortaliza, no existe una diferencia si se emplea lulo o feijoa en la mezcla, su pH está determinado por proporción de la fruta y no por la guatila o espinaca.

Se observan tendencias lineales para la acidez titulable de las mezclas, con una pendiente negativa. No se observan diferencias importantes al realizar la mezcla con guatila o espinaca, las diferencias que se aprecian se deben a las frutas y los valores para las pulpas con lulo son mayores que para las pulpas con feijoa. Por lo tanto, cuando el porcentaje de la pulpa es mayor del 50% no se evidencia ninguna diferencia en la acidez titulable de las cuatro mezclas consideradas.

Al evaluar de forma simultánea el comportamiento del pH y la acidez titulable se puede ver que para las pulpas de feijoa tienen mayores valores de acidez, pero los valores para el pH también son mayores, lo cual podría indicar que los ácidos presentes en las pulpas son débiles. Por esta razón, tal como se discutió previamente, la modificación del valor de pH mediante la adición de pulpa de hortaliza es más difícil; es decir, se necesita adicionar una gran cantidad de pulpa de hortalizas para obtener un cambio relevante en el pH de la pulpa de fruta.

5.3.4 Caracterización de sólidos solubles y totales de mezclas verdes

Se realizó la determinación de los sólidos solubles y totales en las mezclas verdes. En todos los casos se presentó un comportamiento inversamente proporcional con la adición de la pulpa de hortaliza (espinaca o guatila). Se observó que cuando el porcentaje de hortaliza en la mezcla es menor del 50% no hay diferencia en los sólidos solubles si se emplea espinaca o guatila. Los sólidos totales en las mezclas verdes dependen de la fruta empleada (feijoa o lulo), sin importar la cantidad de pulpa de hortaliza en la mezcla.

5.3.5 Análisis estadístico de resultados de caracterización para la selección de mezclas verdes

Con los resultados obtenidos para la caracterización fisicoquímica de las mezclas verdes se realizó el análisis por componentes principales que se presenta en la Figura 5.16. Este análisis permite describir la información proporcionada por todas las variables de respuesta de una forma simultánea por medio de combinaciones lineales. En este caso los componentes principales explican un 93% de la varianza total.

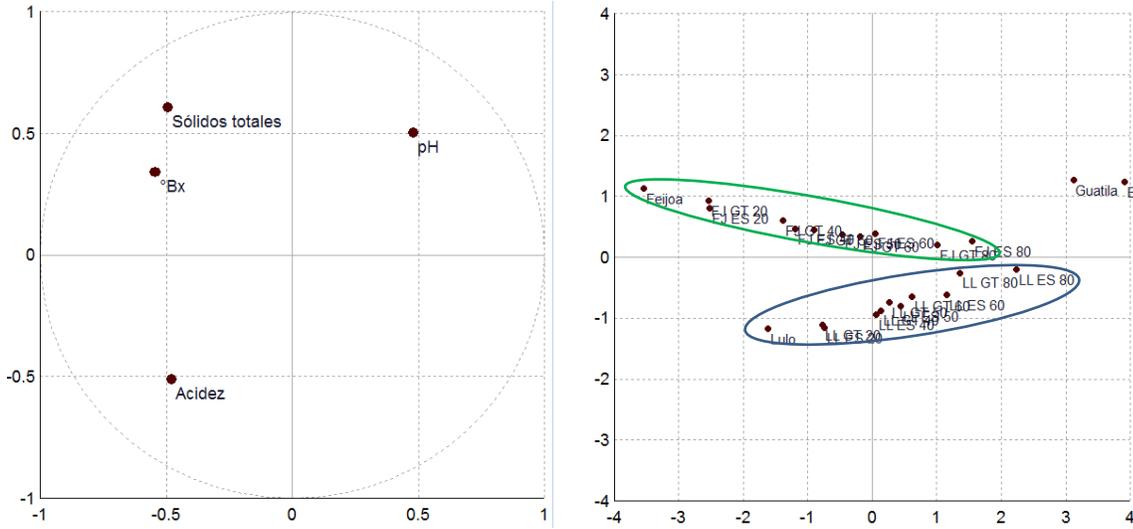


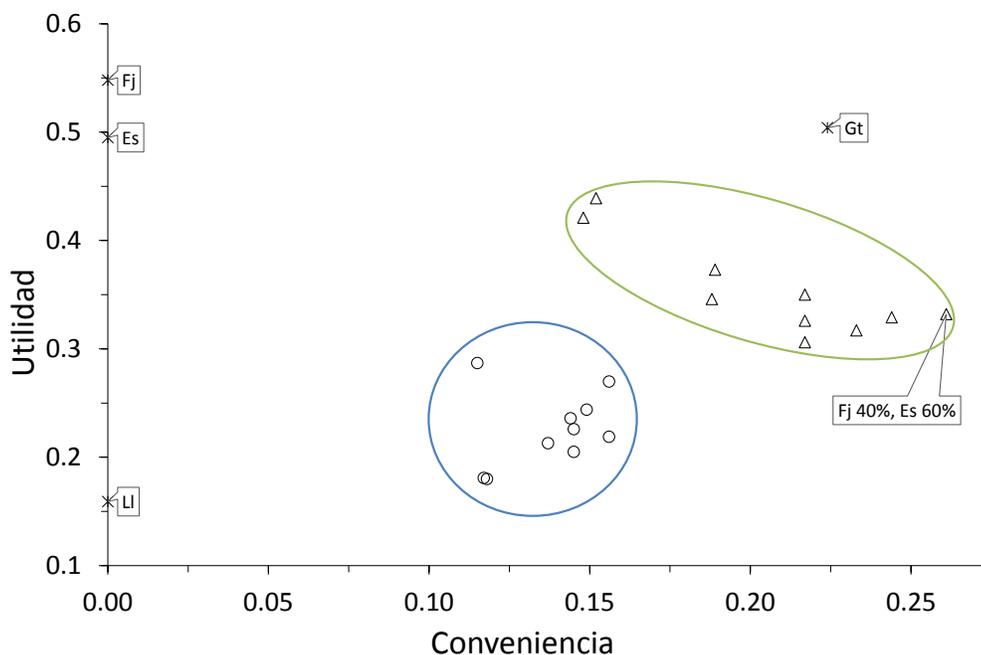
Figura 5.16: Análisis por componentes principales a partir de la caracterización de mezclas verdes.

Se observa un patrón similar al obtenido para las mezclas amarillas: debido a su cercanía con el eje x, la variable de respuesta que tiene una mayor influencia sobre el primer componente principal es la acidez titulable. Así mismo, la acidez, los sólidos solubles y totales influyen sobre el segundo componente principal. En este caso los sólidos solubles y totales también se encuentran en el segundo cuadrante, lo que indica que se encuentran correlacionados tal como se discutió previamente.

Pueden identificarse dos grupos de muestras definidos especialmente por las frutas empleadas y no se evidencia una diferencia sobre las propiedades de la mezcla debida al empleo guatila o espinaca, en especial al observar que tanto la pulpa de guatila como la de espinaca se encuentran por fuera de los grupos identificados. Esto puede explicarse por los valores altos de pH de las hortalizas en comparación con las mezclas, ya que se encuentran en el primer cuadrante del gráfico. Este comportamiento confirma que el efecto de la fruta sobre las propiedades fisicoquímicas de la mezcla es más determinante en comparación con las hortalizas.

Adicionalmente se realizó el análisis estadístico de ordenamiento, de acuerdo con los criterios establecidos en la Tabla 3-9. Los resultados se muestran en la Figura 5.17. Al igual que en el análisis por componentes principales, pueden las muestras agruparse de acuerdo con la pulpa de la fruta empleada (ya sea lulo o feijoa). Debido a esto no se

presenta una diferencia importante sobre el potencial fermentativo si se emplea pulpa de guatila o espinaca en la mezcla.



Mezclas: Lulo – Espinaca o Guatila (o), Feijoa – Espinaca o Guatila (Δ).

Figura 5.17: Análisis de utilidad y conveniencia de la caracterización de mezclas verdes.

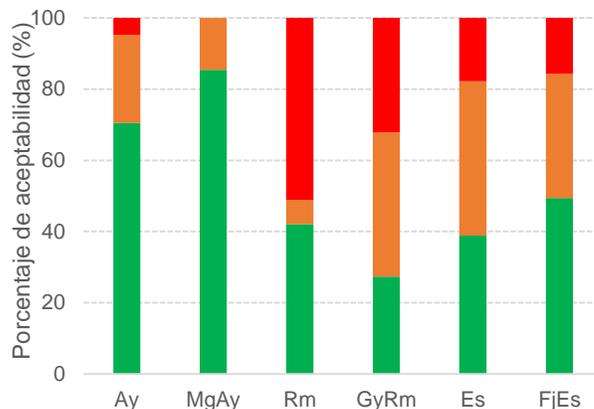
No se observa un patrón definido en el comportamiento de la utilidad en función de la conveniencia para ninguna de las mezclas, ni tampoco en función de la proporción de las hortalizas en las mezclas (espinaca o guatila). Con excepción de la pulpa de guatila los valores de conveniencia para las pulpas puras, son cero a pesar de tener altos valores para la utilidad, por lo que llama la atención que al mezclar las pulpas la conveniencia aumente significativamente.

Se resalta que la mezcla de 40% pulpa de feijoa y 60% de pulpa de espinaca tiene mayores valores de conveniencia, pero menores valores de utilidad en relación con otras proporciones de la misma mezcla. Sin embargo, es importante recordar que el cálculo de los valores de conveniencia es más estricto en comparación con la utilidad (ver ecuaciones 3.7 y 3.8).

Se seleccionó la mezcla de feijoa (40%) y espinaca (60%) ya que se reconoce que tiene mayor potencial para la fermentación en comparación con las otras mezclas evaluadas y se espera que sus características permitan el mantenimiento y crecimiento de las bacterias que se inocularán posteriormente.

5.4 Análisis sensorial de las mezclas

Se realizó un análisis sensorial hedónico para determinar la aceptación de las mezclas, empleando el método especificado en el apartado 3.2.3. Con el fin de confirmar si la aceptabilidad de las hortalizas aumenta al realizar la mezcla con frutas (ver Figura 5.18), los resultados se complementaron con los obtenidos previamente por (Mancera, 2010), en los cuales se observa un aumento en la aceptabilidad de las pulpas de remolacha y espinaca al disminuir su proporción en mezclas.



Ay: Ahuyama; MgAy: Mezcla amarilla; Rm: Remolacha; GyRm: Mezcla roja; Es: Espinaca; FjEs: Mezcla verde. Percepción del consumidor: Me gusta (■); Ni me gusta ni me disgusta (■); Me disgusta (■). Panel de consumidores (n =90)

Figura 5.18: Resultados de análisis hedónico de las pulpas de hortalizas y mezclas.

En las mezclas amarilla y verde se observa que al adicionar la pulpa de fruta a la hortaliza aumenta el porcentaje de la población que expresa gusto y un descenso en las otras opciones. Se resalta que la mayor parte de la población consultada señala un gusto por la mezcla y en el caso de la amarilla ninguno de los consultados expresó disgusto por el alimento. Sin embargo, en la mezcla roja se presenta una polarización, es decir, se tienen porcentajes similares de la población que manifiesta agrado y desagrado tanto por la pulpa de remolacha como por la mezcla. Incluso, se observa que en la mezcla

aumenta el porcentaje de consultados que no puede tomar una decisión (Ni me gusta ni me disgusta), mientras que los otros disminuyen. Este comportamiento puede deberse a factores culturales y patrones de consumo establecidos previamente.

Al presentarse una reducción en el porcentaje de consumidores que expresaron desagrado, las mezclas resultaron más atractivas para la aplicación de la fermentación láctica, en comparación con las pulpas de hortalizas.

Considerando que los resultados obtenidos para el análisis hedónico fueron determinados para diferentes pulpas por lo que es una variable discreta, se aplicó la prueba de Chi², partiendo de la hipótesis nula de que no existe ninguna asociación entre la elección del consumidor y la muestra. Dado que tanto el valor calculado de p es igual a 0 para el coeficiente de Pearson y para la relación de verosimilitud, puede descartarse la hipótesis nula. Por lo tanto, puede deducirse que el consumidor toma la decisión de aceptar o rechazar el producto en función de la pulpa que pruebe.

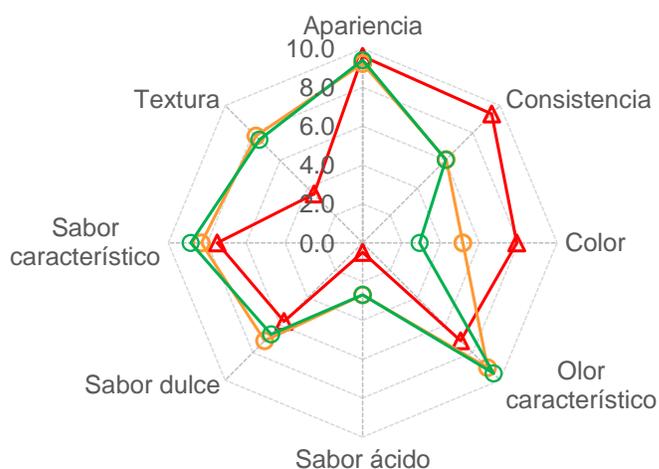
Teniendo en cuenta estos resultados, la mezcla más atractiva para la aplicación de la fermentación es la amarilla. Por lo tanto, se realizaron pruebas descriptivas de acuerdo con lo detallado en el apartado 3.2.3, con el objetivo de establecer los cambios producidos en las propiedades organolépticas a partir de la mezcla de mango y ahuyama. Los resultados se muestran en la Tabla 5-4 y la Figura 5.19

Tabla 5-4. Evaluación sensorial por panelistas de pulpas de ahuyama, mango y mezcla amarilla.

Propiedad	Ahuyama	Mango	Mezcla amarilla
Apariencia	9.60 ± 0.66 ^a	9.41 ± 0.52 ^a	9.22 ± 1.58 ^a
Consistencia	9.38 ± 0.75 ^a	6.05 ± 0.92 ^b	6.07 ± 1.79 ^b
Color	7.93 ± 0.94 ^a	2.93 ± 0.60 ^c	5.15 ± 1.27 ^b
Olor característico	7.13 ± 1.17 ^b	9.51 ± 0.45 ^a	9.09 ± 0.76 ^a
Sabor ácido	0.50 ± 0.55 ^d	2.68 ± 0.48 ^c	2.68 ± 1.28 ^c
Sabor dulce	6.66 ± 0.69 ^b	5.72 ± 1.23 ^{ab}	7.13 ± 1.41 ^a
Sabor característico	7.49 ± 1.10 ^a	8.85 ± 0.66 ^a	8.32 ± 1.67 ^a
Textura	3.55 ± 1.42 ^b	7.51 ± 0.43 ^a	7.77 ± 1.63 ^a

Los valores medios ± SD (n=12) que no comparten una letra, en la misma fila, son significativamente diferentes con un nivel de confianza del 95%. Escala de intensidad (1-10)

Para las pulpas de ahuyama y de mango se obtuvo una apariencia adecuada, sin defectos (partículas extrañas, semillas, residuos de cáscaras, manchas blancas o de colores oscuros, mohos). La textura de la ahuyama se consideró grumosa, un poco áspera y la del mango se valoró como suave a pesar de que no se retiraron las fibras propias de la fruta. La consistencia de la ahuyama fue cercana a la de un pudín y la de mango se encontró más fluida. El color de la ahuyama fue anaranjado intenso y para el mango cercano al amarillo. El olor y el sabor característicos fueron intensos en los dos casos.



Pulpas: ahuyama (Δ), mango (○) y mezcla (○).

Figura 5.19: Análisis descriptivo (QDA) para ahuyama, mango y mezcla amarilla.

Ya que la proporción de mango en la mezcla es alta, es comprensible que su perfil sensorial sea más cercano a la pulpa de mango que a la de ahuyama. Solo en el color se observan diferencias significativas entre las tres pulpas (ahuyama, mango y mezcla).

La apariencia fue considerada como adecuada, sin defectos; la consistencia se valoró como cercana a la de un pudín, el olor y el sabor característicos se cuantificaron como altos y el sabor dulce fue valorado en un punto medio. A pesar de no haber aplicado ninguna operación adicional para retirar grumos o fibras de las pulpas la mezcla tuvo una alta calificación para la textura.

En resumen, puede decirse que:

A partir de los resultados de la caracterización de las propiedades fisicoquímicas no se observan interacciones al realizar la mezcla de una fruta y un vegetal. Se observaron

tendencias lineales en función de la cantidad de pulpa de hortaliza en todos los casos, con excepción del pH, tal como se esperaba. Las pendientes fueron negativas o positivas dependiendo de los valores obtenidos para las pulpas sin mezclar. De presentarse interacciones entre los compuestos de la fruta y el vegetal no se tendrían tendencias lineales.

Considerando los resultados de la caracterización del color solo se observan interacciones al realizar la mezcla en pulpas verdes, debido a la susceptibilidad de las clorofilas frente al bajo pH. El color de la mezcla está definido por la cantidad de pulpa de hortaliza y por la similitud entre el color de la fruta y de la hortaliza.

Se empleó el método de ordenamiento de conveniencia y utilidad para la selección de mezclas con un alto potencial para la fermentación. Se consideró que en la mayor parte de los casos las frutas tienen valores altos de sólidos solubles y acidez titulable en comparación con las hortalizas. Se estimó que la adición de pulpa de hortaliza a la pulpa de fruta puede balancear estas propiedades. Sin embargo, puede que los pesos considerados para cada propiedad (ver Tabla 3-9) influyan significativamente en el resultado. Reconociendo esta limitante, se podría mejorar la aplicación del método si se considera la obtención de los pesos para cada variable de una forma más objetiva (por ejemplo, mediante la consulta a expertos en fermentación láctica) y/o incluyendo variables adicionales (por ejemplo los costos asociados a cada pulpa, la caracterización en compuestos con actividad antirradicalaria, antimicrobiana o prebiótica, entre otros)

A manera de conclusión de la caracterización fisicoquímica de las tres mezclas seleccionadas y como conclusión del presente capítulo se presenta la Tabla 5-5.

Tabla 5-5. Caracterización fisicoquímica de las mezclas amarilla, roja y verde.

Mezcla	Composición (% p/p)	pH	Acidez titulable (meq. ácido/ g pulpa)	Sólidos solubles (°Brix)	Sólidos Totales (% p/p)
Amarilla	Mango: 80	4.60	0.027	11.18	12.80
	Ahuyama: 20				
Roja	Guayaba:40	4.73	0.037	7.15	9.90
	Remolacha: 60				
Verde	Feijoa: 40	3.98	0.140	7.18	11.20
	Espinaca: 60				

6. Evaluación de la fermentación

La evaluación de la fermentación láctica se realizó en dos etapas, con el objetivo de estudiar el efecto de las condiciones de operación y confirmar la viabilidad del proceso en los diferentes sustratos.

En la primera, se evaluó el efecto de dos operaciones previas que pueden favorecer la adaptación y el crecimiento de las bacterias lácticas en los sustratos: la neutralización del sustrato y el acondicionamiento del cultivo. Estos procesos son importantes si se consideran las características fisicoquímicas de las pulpas de frutas (bajo pH y alta acidez titulable), la sensibilidad de las bacterias lácticas a estas condiciones de pH y antecedentes de fermentación de sustratos con bajo pH. Para cada una de los procesos se realizó el diseño de un experimento específico y los principales resultados se muestran en el presente capítulo. Los detalles pueden consultarse en el ANEXO D.

Con los resultados obtenidos se realizó la segunda etapa: el estudio de la fermentación en las mezclas amarilla, roja y verde. Para esta evaluación se consideró el efecto del tipo de cultivo empleado sobre las características fisicoquímicas y sensoriales de las mezclas.

6.1 Estudio de operaciones previas

6.1.1 Diseño experimental para evaluar la neutralización

Se obtuvieron pulpas de las frutas seleccionadas en el capítulo 4 (mora, fresa, guayaba, uchuva, maracuyá, mango lulo y feijoa) empleando el procedimiento del apartado 3.3.1.

Se realizaron experimentos con el objetivo de determinar la influencia de la neutralización sobre el color de las pulpas, ya que es la propiedad organoléptica más sensible a los cambios de pH. Como variable de estudio se consideró el volumen de hidróxido adicionado y como variables de respuesta el pH y el color, las cuales se determinaron

después de cada adición de NaOH (4% p/v) mediante las metodologías de la Tabla 3-3. El procedimiento para la neutralización se detalló en el apartado 3.3.3. Los cálculos de diferencias de color se realizaron de acuerdo con lo detallado en el apartado 3.2.1. Nuevamente se resalta que el empleo de hidróxido de sodio se realizó con el fin de evaluar la viabilidad de la neutralización, no para la obtención del alimento fermentado, es decir, no se empleó para el consumo humano.

Con el objetivo de evaluar si la neutralización favorece la viabilidad de las bacterias lácticas, se realizaron ensayos de fermentación con pulpas neutralizadas. Para ello, se seleccionaron las pulpas de fresa, uchuva y lulo, ya que sus características de pH y acidez no son benéficas para las bacterias lácticas, razón por la cual las mezclas de estas frutas con hortalizas fueron descartadas en la selección realizada en el capítulo 5.

Se neutralizaron las pulpas hasta llegar a un pH mayor a 5 y posteriormente se fermentaron durante un periodo de 12 horas de acuerdo con el procedimiento establecido en el apartado 3.3.4. Se empleó el cultivo mixto 1 (ver apartado 3.1.2) a las pulpas neutralizadas y sin neutralizar, en una concentración aproximada de 1×10^3 UFC/g. Los ensayos se realizaron por triplicado. Se usó ANOVA como método estadístico (ver apartado 3.4.1). Todos los detalles de la caracterización de pH y color pueden consultarse en el ANEXO D.

6.1.2 Resultados de la neutralización

▪ *Neutralización de pulpas de frutas rojas*

Se observó que el aumento del pH con la neutralización tiene un comportamiento diferente para cada pulpa, el cual se resume en la Tabla 6-1. Cada una de las pulpas necesitó una cantidad diferente de NaOH 1N para alcanzar un nivel de pH cercano a la neutralidad, siendo menor para la guayaba y puede decirse que neutraliza con una mayor facilidad. Dados estos resultados, se decidió adicionar el hidróxido en alícuotas inferiores (0.4 mL en lugar de 1.0mL), encontrando un aumento de pH proporcional al volumen de NaOH adicionado. Las diferencias absolutas del color debido a la neutralización, son significativas para todas las frutas rojas, siendo mayores para mora y fresa e inferiores para guayaba.

Tabla 6-1. Atributos y diferencias de color en las pulpas de frutas rojas debidas a la neutralización.

Fruta	pH	Vol NaOH 1N (mL)	L*	a*	b*	ΔE
Mora	3.50 ± 0.00 ^a	0	21.83 ± 0.02 ^a	37.06 ± 0.03 ^a	13.79 ± 0.04 ^a	20.05 ± 0.05 ^a
	5.24 ± 0.01 ^b	6.0	28.07 ± 0.03 ^b	23.98 ± 0.03 ^b	-0.06 ± 0.03 ^b	
Fresa	3.71 ± 0.04 ^c	0	42.01 ± 0.01 ^c	30.21 ± 0.01 ^c	18.32 ± 0.02 ^c	19.83 ± 0.01 ^b
	5.85 ± 0.02 ^d	4.0	45.49 ± 0.03 ^d	11.45 ± 0.01 ^d	12.93 ± 0.02 ^d	
Guayaba	4.20 ± 0.01 ^e	0	47.77 ± 0.01 ^e	27.89 ± 0.02 ^e	20.31 ± 0.01 ^e	0.88 ± 0.004 ^c
	5.55 ± 0.03 ^f	1.6	46.95 ± 0.01 ^f	27.30 ± 0.01 ^f	19.97 ± 0.01 ^f	

Los valores medios ± SD (n=3) que no comparten una letra, en la misma columna, son significativamente diferentes con un nivel de confianza del 95%.

- *Neutralización de pulpas de frutas amarillas.*

Los resultados para las pulpas amarillas se presentan en la Tabla 6-2. Luego de la adición del volumen máximo de hidróxido (6mL), el pH de las pulpas de uchuva y maracuyá aumentó menos de lo esperado (5.5 y 4.0 respectivamente). El comportamiento de la pulpa de mango fue similar al observado en la pulpa de guayaba. Por ello, se neutralizó la pulpa agregando volúmenes de solución más pequeños (0.2mL en vez de 1.0mL), obteniendo un aumento de pH proporcional a la adición NaOH. Las diferencias en el color de las pulpas amarillas fueron significativas.

Tabla 6-2. Atributos y diferencias de color en las pulpas de frutas amarillas debidas a la neutralización.

Fruta	pH	Vol NaOH 1N (mL)	L*	a*	b*	ΔE
Mango	4.44 ± 0.02 ^a	0	55.89 ± 0.01 ^a	13.22 ± 0.01 ^a	69.06 ± 0.04 ^a	4.58 ± 0.05 ^a
	6.04 ± 0.02 ^b	0.6	52.40 ± 0.01 ^b	13.51 ± 0.01 ^b	66.11 ± 0.09 ^b	
Uchuva	4.00 ± 0.04 ^c	0	53.36 ± 0.00 ^c	23.41 ± 0.02 ^c	53.16 ± 0.19 ^c	9.09 ± 0.13 ^b
	5.59 ± 0.03 ^e	6.0	49.34 ± 0.01 ^d	22.18 ± 0.01 ^d	61.22 ± 0.05 ^d	
Maracuyá	3.56 ± 0.04 ^d	0	48.09 ± 0.01 ^e	23.01 ± 0.01 ^e	63.35 ± 0.08 ^e	1.82 ± 0.09 ^c
	4.12 ± 0.02 ^f	6.0	47.86 ± 0.02 ^f	21.97 ± 0.03 ^f	61.88 ± 0.05 ^f	

Los valores medios ± SD (n=3) que no comparten una letra, en la misma columna, son significativamente diferentes con un nivel de confianza del 95%.

- *Neutralización de pulpas verdes*

Para ninguna de las pulpas verdes (feijoa y lulo) se alcanzó un pH mayor de 4.7 después de la adición máxima de hidróxido de sodio (6mL NaOH 1N en 30g pulpa) (ver Tabla 6-3). Las diferencias en las coordenadas del color son significativas, a pesar de ser pequeñas y no haber aumentado el pH como se esperaba. La más importante se

encuentra para la pulpa de feijoa, en la que el valor de a^* pasa de 0.25 a 1.57 y considerando que corresponde a la coordenada que va de verde a rojo, este aumento afecta significativamente el color de la pulpa.

Tabla 6-3. Atributos y diferencias de color en las pulpas de frutas verdes debidas a la neutralización.

Fruta	pH	Vol NaOH 1N (mL)	L*	a*	b*	ΔE
Feijoa	3.49 ± 0.01^a	0	52.20 ± 0.03^a	0.25 ± 0.02^a	30.67 ± 0.03^a	2.57 ± 0.02^a
	4.68 ± 0.03^b	6.0	50.41 ± 0.02^b	1.57 ± 0.01^b	29.39 ± 0.02^b	
Lulo	3.52 ± 0.03^c	0	45.72 ± 0.02^c	10.77 ± 0.03^c	50.82 ± 0.04^c	3.79 ± 0.06^b
	4.61 ± 0.01^d	6.0	45.57 ± 0.02^d	9.32 ± 0.02^d	47.32 ± 0.03^d	

Los valores medios \pm SD ($n=3$) que no comparten una letra, en la misma columna, son significativamente diferentes con un nivel de confianza del 95%.

Para las tres pulpas (amarilla, roja y verde) se observó que las diferencias encontradas en la neutralización de las pulpas pueden estar asociadas con el tipo de los ácidos y los diferentes sistemas de equilibrio (disociación) presentes en cada fruta.

- *Evaluación de la fermentación con pulpas neutralizadas.*

Los resultados de la evaluación de la fermentación se presentan en la Tabla 6-4. No se presenta descenso en el pH de las pulpas después de la fermentación y el conteo de bacterias lácticas es cero en todos los casos, lo que demuestra que los microorganismos inoculados no sobrevivieron. Por lo tanto, se confirmó que, bajo las condiciones de estudio, la neutralización no cambia la viabilidad de la fermentación láctica en las pulpas de frutas. El deterioro presentado en las propiedades sensoriales (olor, sabor y color) después de la neutralización se intensificó después de la fermentación.

Tabla 6-4. Valoración de pH y bacterias lácticas en pulpas de fresa, uchuva y lulo neutralizadas e incubadas.

Variable	Fresa	Uchuva	Lulo
pH pulpa sin neutralizar	3.54 ± 0.10^a	3.93 ± 0.10^a	3.43 ± 0.09^a
pH pulpa neutralizada sin incubar ($t = 0$)	5.77 ± 0.12^b	5.65 ± 0.10^b	5.49 ± 0.08^b
pH pulpa neutralizada incubada (42°C , $t = 12\text{h}$)	5.70 ± 0.08^b	5.55 ± 0.08^b	5.38 ± 0.11^b
Bacterias lácticas después de incubación 12h (UFC/g)	0	0	0

Los valores medios \pm SD ($n=3$) que no comparten una letra, en la misma columna, son significativamente diferentes con un nivel de confianza del 95%.

En conclusión, se descartó la neutralización como un tratamiento previo a la fermentación reconociendo que:

- Se observó un deterioro significativo del color de las pulpas.
- Se presentó un deterioro notable en otras propiedades organolépticas características de las pulpas como aroma y sabor, razón por la cual se tomó la decisión de no realizar mediciones sensoriales.
- No se observó mantenimiento ni crecimiento de las bacterias inoculadas.
- Muchos de los compuestos con actividad antioxidante son los que le proporcionan el color (antocianinas, carotenoides y/o clorofilas), por lo que se consideró el posible deterioro de las propiedades bioactivas. Algunos estudios han relacionado la actividad antirradicalaria de diversos compuestos con el aumento del pH del medio en el que se encuentra. Los hallazgos muestran cambios en los mecanismos de acción y disminución de la actividad. (Nicoli *et al.*, 1999; Friedman and Jürgens, 2000; Lemańska *et al.*, 2001; Sant'Anna *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2018).

6.1.3 Diseño experimental el acondicionamiento de los cultivos

El objetivo de la evaluación del acondicionamiento del cultivo es confirmar si esta operación favorece el ajuste de las bacterias lácticas a las condiciones del sustrato produciéndose la fermentación del mismo. Por lo tanto, como variables de estudio se tuvieron: (1) el sustrato (pulpas de frutas o de hortalizas) y (2) el medio en el cual se realizó el acondicionamiento (agua, bebida de soya o de avena). Se establecieron como variables de respuesta: pH, acidez titulable, sólidos solubles y bacterias lácticas, las cuales fueron determinadas mediante los métodos especificados en el apartado 3.2.1.

La Figura 6.1 y la Tabla 6-5 presentan el esquema de los ensayos realizados. Se emplearon los detallados en el apartado 3.3.3 y se realizaron fermentaciones de acuerdo con el apartado 3.3.4, durante periodos de 24h para las frutas y 6h para las hortalizas. Se empleó el cultivo mixto 1 (ver apartado 3.1.2). Con el fin de detectar cambios en las pulpas que no estuvieran asociados con la actividad de las bacterias lácticas inoculadas, se incubó una muestra "control", la cual fue incubada sin la adición del inóculo durante el tiempo de fermentación de todo el ensayo. Cada ensayo se realizó por duplicado. Los detalles de los resultados pueden consultarse en el ANEXO D.

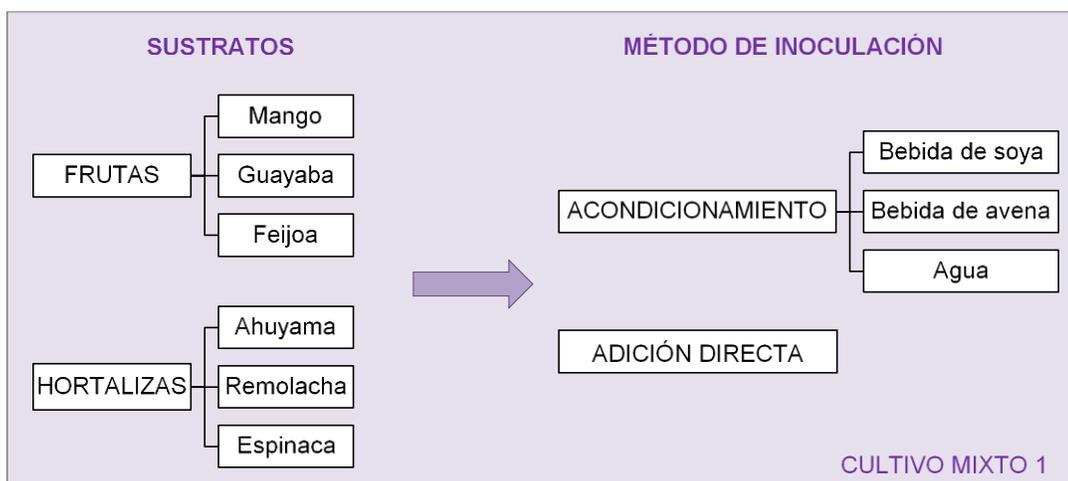


Figura 6.1: Esquema para la evaluación del acondicionamiento en diferentes sustratos.

Tabla 6-5 Esquema de ensayos para la evaluación del acondicionamiento del cultivo.

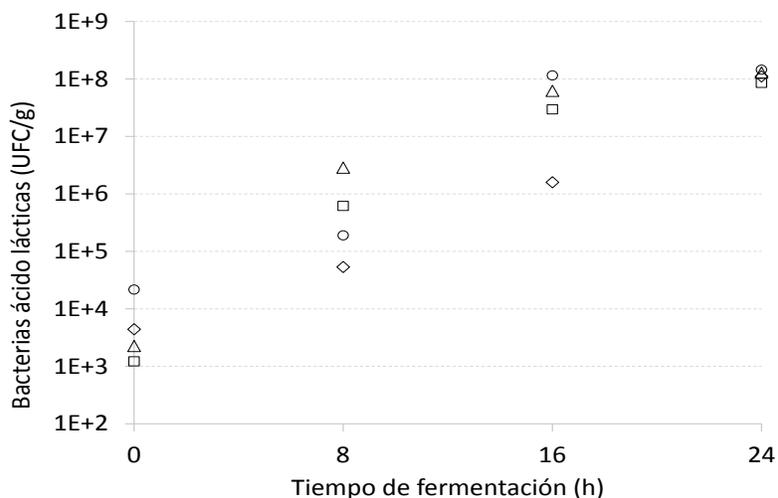
Pulpa		Nomenclatura para el acondicionamiento			
		Bebida de soya	Bebida de avena	Agua	Ninguno
Frutas	Mango	Mg – S	Mg – Av	Mg – H ₂ O	Mg
	Guayaba	Gy – S	Gy – Av	Gy – H ₂ O	Gy
	Feijoa	Fj – S	Fj – Av	Fj – H ₂ O	Fj
Hortalizas	Ahuyama	Ay – S	Ay – Av	Ay – H ₂ O	Ay
	Remolacha	Rm – S	Rm – Av	Rm – H ₂ O	Rm
	Espinaca	Es – S	Es – Av	Es – H ₂ O	Es

6.1.4 Resultados del acondicionamiento de los cultivos

- *Fermentación de pulpas de frutas*

Se presentaron diferencias significativas en las características fisicoquímicas de las pulpas de guayaba y feijoa, debido a la adición del medio en el que se acondicionó el cultivo (agua, bebida de soya o avena). Sin embargo, no se observó ni mantenimiento ni crecimiento bacteriano en ninguno de los casos y se consideró que los cultivos inoculados no sobrevivieron a las condiciones de los sustratos. En consecuencia, al comparar las caracterizaciones antes y después de la fermentación no se observaron diferencias significativas en las propiedades fisicoquímicas (pH, la acidez titulable y los sólidos solubles).

Para la pulpa de mango se presentó descenso en el pH y aumento en la acidez titulable debido al mantenimiento y crecimiento bacteriano, como puede observarse en la Figura 6.2 y en la Tabla 6-6.



Sustratos: Mg sin acondicionamiento (◇), Mg-S (□), Mg-H₂O (Δ), Mg-Av (o)

Figura 6.2: Crecimiento bacteriano durante la fermentación de mango con y sin acondicionamiento del cultivo.

Tabla 6-6. Propiedades fisicoquímicas antes y después de la fermentación de mango, con y sin acondicionamiento del cultivo.

Tratamiento	Tiempo incubación (h)	°Brix	pH	Acidez titulable (meq. ácido / g pulpa)
Mango (Mg) sin acondicionamiento	0	10.9 ± 1.6 ^a	4.23 ± 0.04 ^a	0.030 ± 0.006 ^d
	24	10.8 ± 1.7 ^a	3.85 ± 0.04 ^c	0.053 ± 0.012 ^{bc}
	24 (Control)	10.8 ± 1.6 ^a	4.28 ± 0.03 ^a	0.030 ± 0.007 ^d
Mango-Agua (Mg-H ₂ O)	0	11.0 ± 1.1 ^a	4.21 ± 0.19 ^a	0.029 ± 0.009 ^d
	24	10.5 ± 1.9 ^a	3.80 ± 0.12 ^c	0.053 ± 0.011 ^{bc}
	24 (Control)	10.7 ± 1.8 ^a	4.15 ± 0.17 ^{ab}	0.029 ± 0.008 ^d
Mango-Avena (Mg-Av)	0	12.7 ± 1.4 ^a	4.23 ± 0.05 ^a	0.030 ± 0.001 ^d
	24	12.5 ± 2.1 ^a	3.77 ± 0.02 ^c	0.106 ± 0.003 ^a
	24 (Control)	12.4 ± 2.1 ^a	4.22 ± 0.01 ^a	0.030 ± 0.001 ^d
Mango-Soya (Mg-S)	0	10.5 ± 1.9 ^a	4.43 ± 0.12 ^a	0.032 ± 0.008 ^{cd}
	24	10.4 ± 2.0 ^a	3.91 ± 0.18 ^{bc}	0.072 ± 0.020 ^b
	24 (Control)	10.4 ± 1.9 ^a	4.44 ± 0.12 ^a	0.032 ± 0.008 ^{cd}

Los valores medios ± SD (n=2) que no comparten una letra, en la misma columna, son significativamente diferentes con un nivel de confianza del 95%.

A pesar de que se presentan diferencias en la velocidad de crecimiento cuando se realiza previamente el acondicionamiento del cultivo, después de las 24 horas de fermentación en todos los casos se alcanza un crecimiento bacteriano similar. Después de 24h de fermentación el conteo de bacterias lácticas llega a 1×10^8 UFC/g, cumpliendo con los niveles mínimos establecidos en un alimento con probióticos para tener una actividad funcional en el consumidor (1×10^6 UFC/g).

Debido al crecimiento de las bacterias inoculadas se esperaba un descenso en los sólidos solubles, en especial, si se considera como una medida indirecta de los carbohidratos solubles (fuentes de carbono), que son los componentes que más inciden en la medida. Sin embargo, las diferencias presentadas no son significativas.

A pesar de ello, pueden presentarse dos fenómenos que compensan el consumo de los azúcares porque afectan el índice de refracción de la luz: el primero la hidrólisis de la sacarosa en glucosa y fructosa, considerando que las bacterias consumen preferentemente el primero, la fructosa se acumula en el medio influyendo en la medida; y el segundo la producción de ácidos orgánicos. Este comportamiento también puede sugerir que las bacterias inoculadas prefieren una fuente de carbono diferente de la sacarosa, glucosa o fructosa, que no afecte significativamente el índice de refracción.

No se observa una diferencia significativa entre los valores de pH en las muestras iniciales y en los controles para ninguna de las pulpas. Sin embargo, el descenso producido por el crecimiento bacteriano es significativo después de 24h de incubación. Bajo las condiciones en las que se realizaron los ensayos, se destaca que no se presenta una diferencia significativa en los valores de pH de las pulpas, cuando se fermentan con o sin acondicionamiento del cultivo en agua, soya o avena.

El comportamiento de la acidez corresponde con el pH. El incremento de la acidez titulable con respecto al valor inicial ($t=0$) para la pulpa sin acondicionamiento fue de 16%. Para las pulpas con acondicionamiento fue: 82% en agua, 125% en soya y 257% en avena. Por lo tanto, se puede decir que el acondicionamiento favorece la acidificación del mango.

- *Fermentación de hortalizas*

En todos los casos se observó un crecimiento de las bacterias inoculadas. Sin embargo, no puede establecerse un patrón en las variables de respuesta que permita identificar una diferencia significativa al emplear el acondicionamiento previo del cultivo. Como ejemplo se presentan los resultados de la caracterización fisicoquímica para la evaluación del acondicionamiento en pulpa de ahuyama en la Tabla 6-7 y en la Tabla 6-8, los resultados del conteo bacteriano para todas las hortalizas.

Tabla 6-7. Propiedades fisicoquímicas antes y después de la fermentación de ahuyama, con y sin acondicionamiento del cultivo.

ID	Tiempo incubación (h)	°Brix	pH	Acidez titulable (meq. ácido /g pulpa)
Ahuyama sin acondicionamiento (Ay)	0	5.9 ± 0.8 ^a	5.69 ± 0.49 ^a	0.015 ± 0.005 ^c
	6	5.9 ± 0.8 ^a	4.20 ± 0.13 ^b	0.050 ± 0.002 ^a
	6 (Control)	5.9 ± 0.8 ^{ab}	5.55 ± 0.62 ^a	0.017 ± 0.007 ^c
Ahuyama-Agua (Ay-H ₂ O)	0	4.2 ± 0.1 ^{bc}	5.34 ± 0.15 ^a	0.017 ± 0.001 ^c
	6	4.1 ± 0.2 ^c	4.18 ± 0.19 ^b	0.043 ± 0.003 ^{ab}
	6 (Control)	3.9 ± 0.2 ^c	5.48 ± 0.01 ^a	0.015 ± 0.002 ^c
Ahuyama-Avena (Ay-Av)	0	5.1 ± 0.4 ^{abc}	5.35 ± 0.11 ^a	0.017 ± 0.001 ^c
	6	4.7 ± 0.3 ^{abc}	4.16 ± 0.15 ^b	0.036 ± 0.003 ^b
	6 (Control)	4.5 ± 0.1 ^{abc}	5.72 ± 0.35 ^a	0.014 ± 0.000 ^c
Ahuyama-Soya (Ay-S)	0	5.5 ± 0.9 ^{abc}	5.97 ± 0.33 ^a	0.014 ± 0.004 ^c
	6	5.8 ± 0.8 ^{ab}	4.12 ± 0.06 ^b	0.051 ± 0.007 ^a
	6 (Control)	5.4 ± 1.1 ^{abc}	5.48 ± 0.89 ^a	0.018 ± 0.007 ^c

Los valores medios ± SD (n=2) que no comparten una letra, en la misma columna, son significativamente diferentes con un nivel de confianza del 95%.

El comportamiento observado para cada una de las propiedades en la fermentación se resume a continuación:

- Sólidos solubles: no se observan diferencias significativas al comparar los sólidos solubles de las diferentes muestras antes y después de la fermentación, solo el descenso debido a la adición del agua.
- pH: en la ahuyama y la remolacha las diferencias significativas se deben únicamente al proceso de fermentación y no al acondicionamiento en agua, avena o soya. Para la espinaca solo es significativo para la pulpa fermentada sin y con acondicionamiento en agua.

- Acidez titulable: en la ahuyama hay diferencia cuando el cultivo se acondiciona en soya o no; es significativamente menor cuando se acondiciona en agua o avena. Luego de 6h de fermentación aumentó la acidez titulable en un 222% sin acondicionamiento. Cuando se acondiciona el cultivo el incremento fue del: 145% en agua, 108% en avena y 260% en soya. En la remolacha no hay diferencia significativa cuando se acondiciona el cultivo en avena. El aumento de acidez cuando se acondiciona en agua es del 55%, en soya del 72% y en avena del 38%, y sin acondicionamiento es aproximadamente del 50%. Para la espinaca se obtuvo un aumento del 50% en la acidez de la pulpa sin acondicionamiento, del 20% en la pulpa acondicionada en agua, del 26% en soya y del 18% en avena.
- Crecimiento bacteriano: en todos los casos se percibe un aumento en el conteo bacteriano, pasando aproximadamente de 10^3 o 10^4 UFC/g a 10^7 o 10^8 UFC/g. En general el crecimiento bacteriano en la pulpa de espinaca fue menor, solo en la pulpa sin tratamiento se alcanza el mismo nivel que en la remolacha y la ahuyama. No se obtuvo crecimiento en ninguno de los controles, por lo que no se incluyen en la tabla. En todos los casos el nivel de concentración de las bacterias lácticas al final del proceso fue mayor que el mínimo requerido (1×10^6 UFC/g) para que se considere como un alimento funcional debido a la viabilidad de las bacterias lácticas.

Tabla 6-8. Detalle de la cantidad de bacterias en las pulpas de hortalizas fermentadas con y sin acondicionamiento previo del cultivo.

Acondicionamiento	Tiempo de incubación (h)	Remolacha (Rm)	Ahuyama (Ay)	Espinaca (Es)
Sin acondicionamiento (adición directa)	0	3.0×10^3	3.4×10^3	1.2×10^4
	3	2.2×10^5	2.7×10^4	2.3×10^5
	6	3.5×10^7	2.5×10^7	1.4×10^7
Agua	0	8.5×10^3	5.8×10^4	1.7×10^3
	3	4.4×10^5	2.3×10^6	1.6×10^4
	6	3.5×10^7	1.1×10^8	2.8×10^6
Bebida de avena	0	5.9×10^3	3.1×10^4	9.1×10^3
	3	3.8×10^5	4.5×10^6	4.5×10^4
	6	3.4×10^7	1.2×10^8	3.1×10^6
Bebida de soya	0	2.1×10^4	5.0×10^3	2.2×10^3
	3	6.9×10^5	1.1×10^5	3.5×10^5
	6	1.4×10^7	2.7×10^7	3.4×10^6

Se destaca que los valores de sólidos solubles en la pulpa de espinaca son más bajos en relación con los valorados para las pulpas de remolacha y de ahuyama. Esto puede afectar la disponibilidad de fuentes de carbono y, a su vez, el crecimiento microbiano, dando como resultado, menores valores de acidez titulable y en consecuencia, valores de pH elevados después de la fermentación, lo cual puede dificultar su conservación.

En conclusión, para la fermentación de frutas únicamente el mango funcionó como sustrato para las bacterias inoculadas. El acondicionamiento en bebida de soya y de avena, favoreció la acidificación. Sin embargo, su influencia sobre la velocidad del crecimiento bacteriano es pequeña y puede deberse a la dilución, considerando que se observa un comportamiento similar al utilizar agua. En todas las pulpas de las hortalizas evaluadas se presentó crecimiento bacteriano. Aunque, se encontraron diferencias significativas en algunas propiedades fisicoquímicas (por ejemplo, en la acidez titulable), tampoco se observa una diferencia importante en el crecimiento bacteriano cuando se realiza o no el acondicionamiento del cultivo.

A partir de estos resultados se concluyó que el acondicionamiento del cultivo no influye significativamente en la fermentación de pulpas de frutas y hortalizas. Esto puede sugerir que: (1) las bacterias crecen de manera adecuada en estos sustratos sin necesitar la acción de sustancias con actividad prebiótica, (2) que el efecto de éstas sustancias puede ser más importante durante el almacenamiento y no durante la etapa de crecimiento y/o (3) que la cantidad (proporción) de la bebida (ya sea de avena o de soya) no fue suficiente para que su efecto fuera significativo. Por lo tanto, se tomó la decisión de evaluar el proceso fermentativo en las mezclas con adición directa del cultivo.

6.2 Fermentación de mezclas

6.2.1 Diseño experimental

Con el objetivo de evaluar la viabilidad técnica de la fermentación se realizaron ensayos experimentales, aplicando los resultados de la primera etapa. En consecuencia, se emplearon las mezclas amarillas, rojas y verdes seleccionadas en el capítulo 5 y el cultivo mixto 1 (apartado 3.1.2) en una dosis aproximada de 1×10^3 UFC/g de mezcla, en adición directa (apartado 3.3.3) y el procedimiento detallado en el apartado 3.3.4.

Con el fin de establecer si estos mismos resultados pueden obtenerse cuando se emplean cultivos diferentes, posteriormente se evaluó la fermentación de las mezclas con el cultivo mixto 2, y con los cultivos simples 1 y 2 (apartado 3.1.2). La Figura 6.3 presenta el esquema para estos ensayos. Cada ensayo de fermentación se realizó por duplicado.

En el presente capítulo se muestran los resultados obtenidos para las mezclas. Puede consultarse el ANEXO D para ver los resultados de la fermentación de pulpas de hortalizas.



Figura 6.3: Esquema para la evaluación de la fermentación con diferentes cultivos.

De acuerdo con la particularidad del proceso aplicado, se espera que las bacterias lácticas crezcan como consecuencia del consumo de las fuentes de carbono disponibles (reducción en los sólidos totales), produciendo ácido láctico, lo que aumenta la acidez titulable y disminuye el pH del sustrato hasta un nivel que inhibe las bacterias presentes en el medio. En consecuencia como variables de respuesta se consideraron las propiedades fisicoquímicas (pH, acidez titulable, sólidos solubles y totales) y el crecimiento de las bacterias inoculadas, determinadas mediante los métodos establecidos en el apartado 3.2.1. Se realizó el seguimiento de estas variables a lo largo de 16 horas de fermentación.

Posteriormente se realizaron pruebas de análisis sensorial de acuerdo con lo detallado en el apartado 3.2.3 con el fin de establecer si la fermentación afecta las propiedades organolépticas y la aceptabilidad de las mezclas.

6.2.2 Resultados de variables fisicoquímicas y crecimiento bacteriano

En la Figura 6.4 se presentan los resultados del seguimiento de sólidos solubles y del conteo de bacterias lácticas realizado para las mezclas: amarilla, roja y verde cuando se realiza la fermentación con el cultivo mixto 1. En la Figura 6.5 se presentan los resultados obtenidos para el seguimiento del pH y la acidez titulable. También se presenta un resumen de estos resultados en la Tabla 6-9 para facilitar la comparación de los mismos.

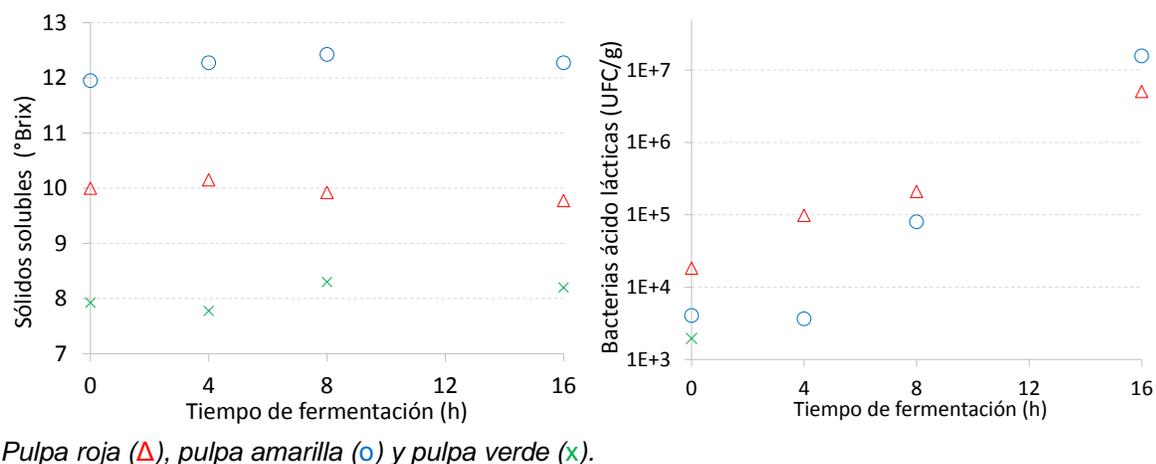


Figura 6.4: Sólidos solubles y bacterias lácticas durante la fermentación de mezclas con el cultivo mixto 1.

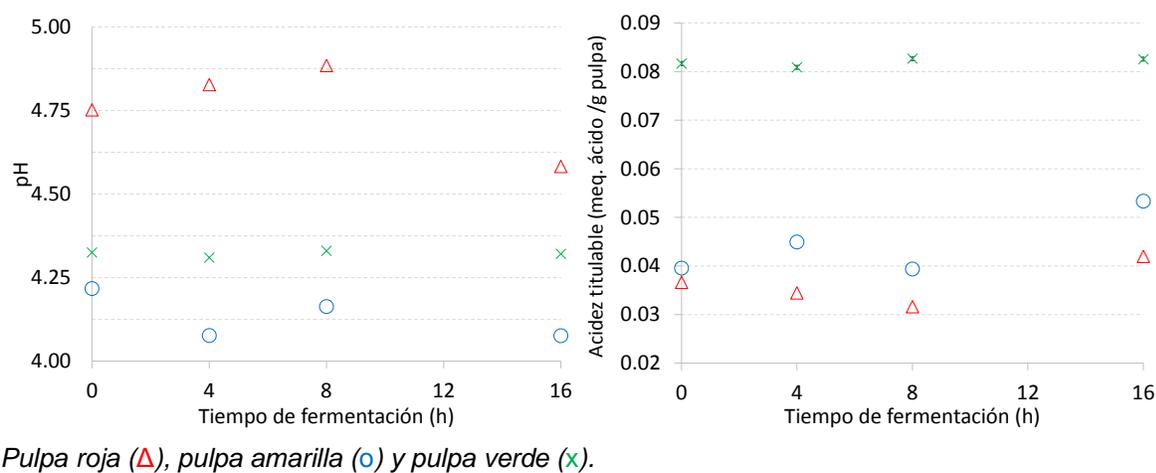


Figura 6.5: pH y acidez titulable durante la fermentación de mezclas con el cultivo mixto 1.

Tabla 6-9. Propiedades fisicoquímicas y cantidad de bacterias lácticas antes y después de la fermentación de mezclas con el cultivo mixto 1.

Mezcla	Tiempo incubación (h)	°Brix	pH	Acidez titulable (meq. ácido /g pulpa)	Bacterias lácticas (UFC/g)
Roja (GyRm)	0	10.0 ± 0.1 ^a	4.75 ± 0.04 ^a	0.040 ± 0.007 ^{bc}	1.8 x 10 ⁴
	16	9.8 ± 0.4 ^a	4.58 ± 0.11 ^b	0.045 ± 0.000 ^{bc}	5.5 x 10 ⁶
	16 (Control)	10.0 ± 0.1 ^a	4.85 ± 0.04 ^a	0.038 ± 0.003 ^c	0
Amarilla (MgAy)	0	12.0 ± 0.4 ^b	4.22 ± 0.05 ^{cd}	0.040 ± 0.002 ^c	4.1 x 10 ³
	16	12.3 ± 0.2 ^b	4.08 ± 0.02 ^e	0.053 ± 0.000 ^b	1.6 x 10 ⁷
	16 (Control)	12.3 ± 0.4 ^b	4.20 ± 0.05 ^{cd}	0.041 ± 0.000 ^{bc}	0
Verde (FjEs)	0	7.9 ± 0.3 ^c	4.33 ± 0.09 ^c	0.090 ± 0.011 ^a	2.0 x 10 ³
	16	8.2 ± 0.2 ^c	4.32 ± 0.05 ^c	0.083 ± 0.004 ^a	0
	16 (Control)	8.4 ± 0.4 ^c	4.32 ± 0.08 ^c	0.086 ± 0.000 ^a	0

Los valores medios ± SD (n=2) que no comparten una letra, en la misma columna, son significativamente diferentes con un nivel de confianza del 95%.

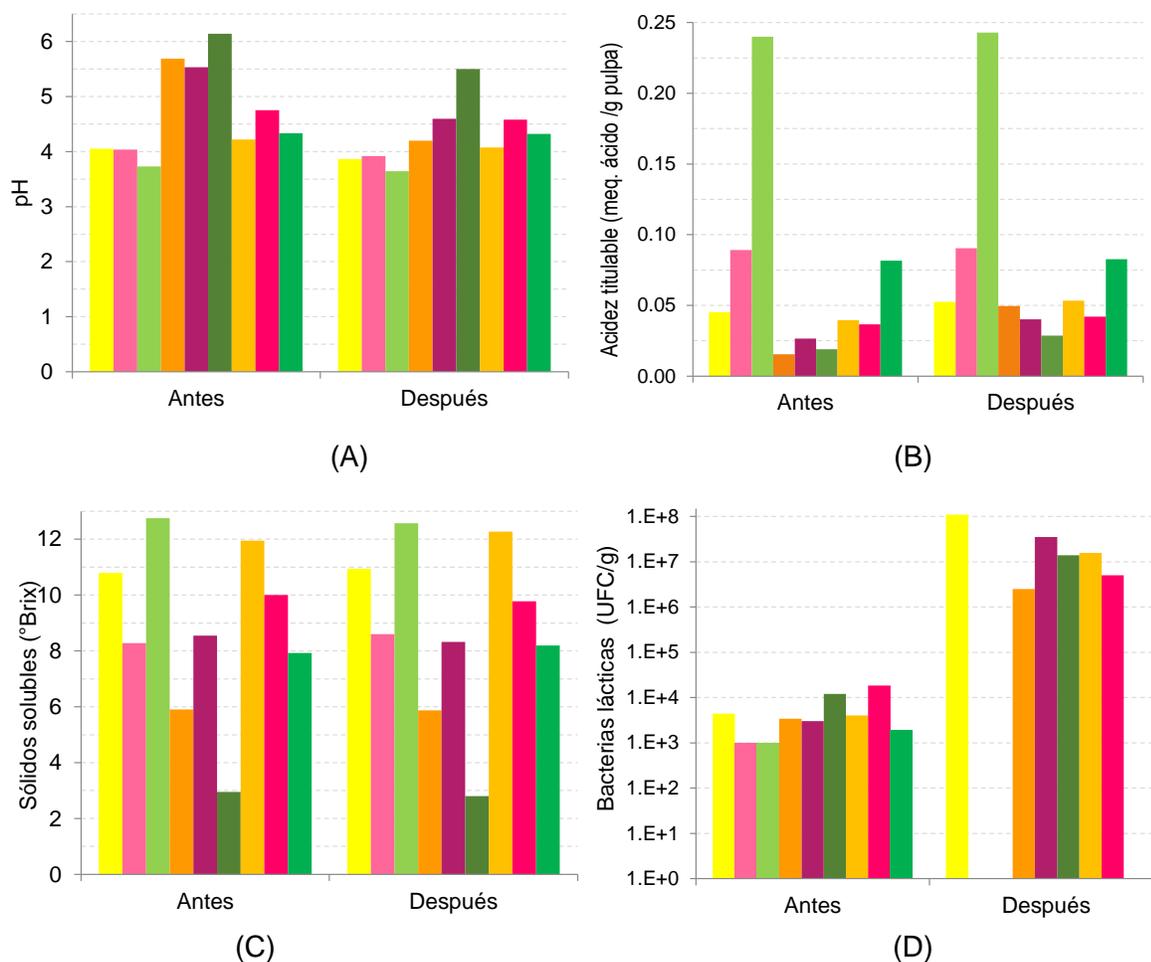
El comportamiento observado en las variables de respuesta cuando se fermentan las mezclas amarilla y roja con el cultivo mixto 1 concuerda con lo esperado: hay un descenso de pH, un aumento de acidez titulable y un crecimiento de las bacterias lácticas inoculadas. Sin embargo, la concentración de sólidos solubles no disminuye significativamente durante el proceso. Se observan diferencias significativas en el pH de las pulpas fermentadas con las iniciales y el control, lo cual confirma que esta pauta se debe la acción de los microorganismos durante la incubación. El anterior comportamiento se repite para la acidez de la pulpa amarilla, pero no para la roja, ya que en esta última el aumento de acidez no es significativo.

En la mezcla verde no se presentó una supervivencia de bacterias lácticas debido a que las características del medio afectan de forma importante su viabilidad. Como resultado, no se presentan cambios significativos en las variables de respuesta (ver Tabla 6-9). Considerando que la pulpa de espinaca tuvo indicadores positivos de fermentación, la inhibición del mantenimiento bacteriano se debe a la adición de la pulpa de feijoa, posiblemente a su bajo pH, alta acidez y al tipo de ácidos orgánicos presentes.

Se presenta un crecimiento significativo de las bacterias lácticas inoculadas en el tiempo de fermentación evaluado, de 4 y 2 órdenes de magnitud para las pulpas amarilla y roja respectivamente. En el caso de la pulpa roja el nivel de concentración de las bacterias

lácticas al final del proceso fue el mínimo requerido (1×10^6 UFC/g) para que se considere como funcional la actividad bacteriana, mientras que en la pulpa amarilla fue superior.

A manera de resumen en la Figura 6.6 se comparan los resultados para la fermentación de todos los sustratos evaluados (frutas, hortalizas y mezclas), con adición directa de cultivo mixto 1.



Sustratos: Mango (■), Guayaba (■), Feijoa (■), Ahuyama (■), Remolacha (■), Espinaca (■), Mango – Ahuyama (■), Guayaba – Remolacha (■), Feijoa – Espinaca (■).

Figura 6.6: (A) pH, (B) acidez titulable, (C) sólidos solubles y (D) bacterias lácticas antes y después de la fermentación de pulpas de frutas, hortalizas y sus mezclas.

En esta figura puede verse: (1) descenso en el pH en las pulpas de hortalizas; (2) aumento en la acidez titulable de las hortalizas y en la mezcla amarilla; (3) crecimiento bacteriano en las pulpas de mango, ahuyama, remolacha, espinaca y en las mezclas

amarilla y roja; (4) muerte de las bacterias lácticas inoculadas en las pulpas de guayaba, feijoa y en la mezcla verde.

Los resultados de la fermentación de las mezclas cuando se emplean otros cultivos se resumen en la Tabla 6-10. Se destaca que no hay una variación significativa para los sólidos solubles al comparar las pulpas iniciales (t=0) y las fermentadas en ninguna de las mezclas.

Tabla 6-10. Propiedades fisicoquímicas y bacterias lácticas antes y después de la fermentación de mezclas con diferentes cultivos.

Mezcla	Cultivo	Tiempo incubación (h)	°Brix	pH	Acidez titulable (meq. ácido /g pulpa)	Bacterias lácticas (UFC/g)
Roja (GyRm)	Mixto 2	0	9.3 ± 0.1 ^b	4.62 ± 0.01 ^a	0.032 ± 0.001 ^{fgh}	2.3 x 10 ³
		16	8.9 ± 0.1 ^{bcd}	4.13 ± 0.01 ^h	0.048 ± 0.001 ^d	3.7 x 10 ⁵
	Simple 1	0	8.9 ± 0.1 ^{bcd}	4.67 ± 0.01 ^a	0.031 ± 0.001 ^{gh}	4.6 x 10 ⁴
		16	9.2 ± 0.1 ^{bc}	4.13 ± 0.03 ^h	0.050 ± 0.004 ^d	5.3 x 10 ⁵
	Simple 2	0	8.9 ± 0.0 ^{bcd}	4.67 ± 0.02 ^a	0.033 ± 0.001 ^{fg}	7.4 x 10 ³
		16	9.0 ± 0.1 ^{bcd}	4.42 ± 0.03 ^{bcde}	0.038 ± 0.001 ^{ef}	0
Amarilla (MgAy)	Mixto 2	0	11.2 ± 0.0 ^a	4.46 ± 0.02 ^{bc}	0.029 ± 0.001 ^{gh}	6.7 x 10 ⁴
		16	11.2 ± 0.1 ^a	4.28 ± 0.01 ^g	0.039 ± 0.001 ^e	3.7 x 10 ⁷
	Simple 1	0	11.2 ± 0.1 ^a	4.47 ± 0.01 ^b	0.027 ± 0.001 ^h	4.3 x 10 ⁴
		16	11.1 ± 0.0 ^a	4.14 ± 0.01 ^h	0.059 ± 0.001 ^c	6.1 x 10 ⁶
	Simple 2	0	11.1 ± 0.0 ^a	4.44 ± 0.01 ^{bcd}	0.027 ± 0.001 ^{gh}	7.2 x 10 ³
		16	11.2 ± 0.1 ^a	4.41 ± 0.01 ^{bcde}	0.029 ± 0.001 ^{gh}	0
Verde (FjEs)	Mixto 2	0	8.5 ± 0.4 ^{de}	4.40 ± 0.02 ^{def}	0.089 ± 0.001 ^a	9.5 x 10 ⁴
		16	8.8 ± 0.2 ^{bcde}	4.36 ± 0.01 ^f	0.091 ± 0.002 ^a	2.3 x 10 ³
	Simple 1	0	8.6 ± 0.3 ^{cde}	4.41 ± 0.01 ^{cde}	0.086 ± 0.001 ^{ab}	9.1 x 10 ⁴
		16	8.4 ± 0.1 ^{de}	4.38 ± 0.01 ^{ef}	0.090 ± 0.002 ^a	5.2 x 10 ⁴
	Simple 2	0	8.2 ± 0.2 ^e	4.42 ± 0.01 ^{bcde}	0.082 ± 0.001 ^b	5.9 x 10 ⁴
		16	8.4 ± 0.2 ^{de}	4.41 ± 0.01 ^{bcde}	0.083 ± 0.001 ^b	0

Los valores medios ± SD (n=2) que no comparten una letra, en la misma columna, son significativamente diferentes con un nivel de confianza del 95%.

Para los diferentes sustratos puede observarse que:

- Mezcla roja: se presenta un mayor crecimiento del cultivo mixto 2 en comparación con el simple 1, por lo que se puede decir que las cepas funcionan mejor en co-cultivo. No se observa mantenimiento microbiano de la cepa de *Bifidobacterium lactis* (cultivo simple 2) luego de las 16 horas de incubación. Sin embargo, las

variaciones presentadas en las propiedades fisicoquímicas pueden indicar una actividad microbiana previa.

- Mezcla amarilla: además de los cambios obtenidos por el proceso fermentativo, se observan variaciones significativas al emplear diferentes cultivos. El pH es más bajo y la acidez más alta con el cultivo simple 1, el cultivo mixto2 y el cultivo simple 2, respectivamente. Se observó un crecimiento y mantenimiento microbiano de las cepas inoculadas acorde con los cambios de las propiedades fisicoquímicas. El cultivo simple 2 no presento mantenimiento posiblemente debido a las condiciones del sustrato (bajo pH y alta acidez).
- Mezcla verde: no se observa crecimiento microbiano en ninguno de los cultivos empleados. Por lo tanto, para los indicadores valorados no se presentan diferencias significativas antes y después de la incubación. Sin embargo, se observó mantenimiento de los cultivos mixto 2 y simple 1, posiblemente debido a que en los dos cultivos está presente la cepa *Lactobacillus acidophilus* que es más resistente a las condiciones del sustrato.

Para complementar estos resultados y confirmar la viabilidad de la fermentación de las hortalizas con otros cultivos, se realizaron ensayos experimentales similares con pulpas de ahuyama, remolacha y espinaca, cuyos resultados pueden consultarse en el ANEXO E. Todas mostraron un mantenimiento y crecimiento microbiano que se refleja a través de los indicadores de fermentación: un descenso significativo en el pH acompañado de un aumento en la acidez titulable. Sin embargo, no se observan diferencias significativas debidas al empleo de uno u otro cultivo.

En conclusión, no se observaron diferencias significativas en la fermentación láctica de las hortalizas y las mezclas al emplear cultivos lácticos con una composición diferente a la del cultivo mixto1. Sin embargo, ya que éste se encuentra con una mayor facilidad en el mercado colombiano se continuó el estudio con este cultivo.

6.2.3 Resultados de la evaluación sensorial

Se realizó la evaluación sensorial de las mezclas con el objetivo de establecer los cambios sensoriales producidos por la fermentación. Para ello se consideraron dos

metodologías (detalladas en el apartado 3.2.3): la primera orientada hacia el consumidor y relacionado con la aceptabilidad de los productos fermentados (análisis hedónico) y la segunda enfocada en el producto y sus atributos sensoriales (análisis descriptivo).

Así, para las pruebas hedónicas se consideró el tipo de cultivo empleado como variable de estudio y la aceptabilidad como variable de respuesta. Para las pruebas descriptivas se empleó la mezcla mejor valorada en las pruebas hedónicas, así, la variable de estudio fue el sustrato y las características organolépticas como variables de respuesta. Los resultados se compararon con los obtenidos para las mezclas antes del proceso fermentativo.

- *Análisis hedónico*

En la Figura 6.7 y la Tabla 6-11, se presentan los resultados para el análisis sensorial hedónico de las diferentes mezclas.

Tabla 6-11. Resultados de análisis sensorial hedónico.

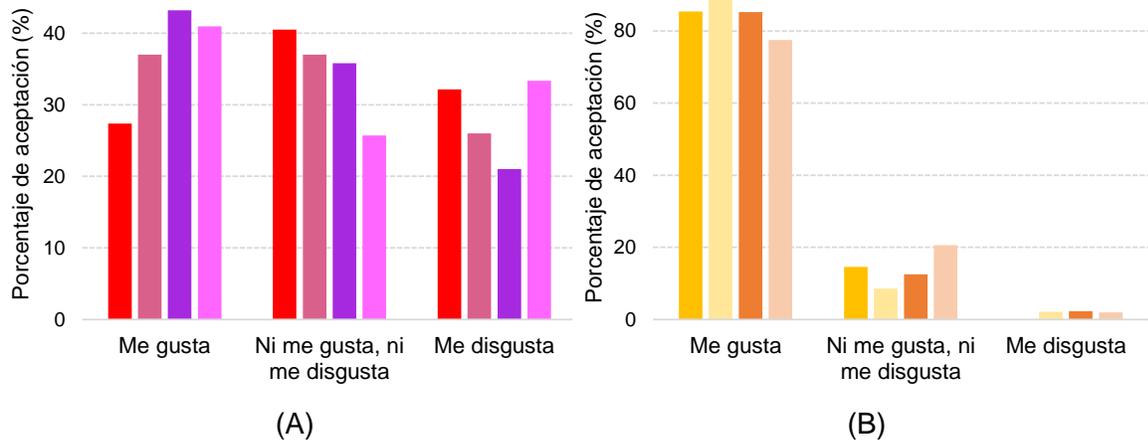
Mezcla	Sin fermentar	Mezcla fermentada		
		Mixto 1	Mixto 2	Simple 1
Roja (<i>GyRm</i>)	2.0 ± 0.8 ^e	2.1 ± 0.8 ^{de}	2.2 ± 0.8 ^{cde}	2.1 ± 0.9 ^{de}
Amarilla (<i>MgAy</i>)	2.9 ± 0.4 ^a	2.9 ± 0.4 ^a	2.8 ± 0.4 ^a	2.8 ± 0.5 ^{ab}
Verde (<i>FjEs</i>)	2.3 ± 0.7 ^{cd}	----	2.3 ± 0.8 ^{cd}	2.5 ± 0.7 ^{bc}

Los valores medios ± SD (n=90) que no comparten una letra, son significativamente diferentes con un nivel de confianza del 95%.

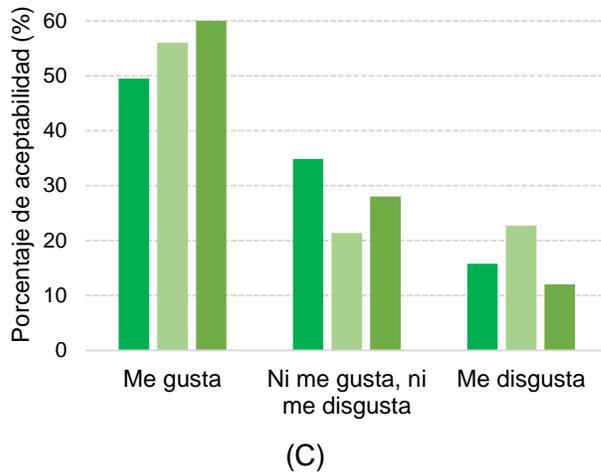
En la mezcla roja no se observan diferencias significativas entre muestra fresca y la fermentada con los diversos cultivos (Figura 6.7 (A) y Tabla 6-11). Sin embargo, el perfil de aceptación cambia con la fermentación: en la pulpa sin fermentar solo el 27% de los consumidores expresa agrado, mientras que en la pulpa fermentada se tiene: 37% para el cultivo mixto 1, 41% para el cultivo simple y 43% para el mixto 2.

Los consumidores expresaron que la remolacha domina el perfil sensorial de la mezcla. Por lo tanto, si la hortaliza es del agrado del consumidor la mezcla es aceptada. Debido a que durante la fermentación aumenta la acidez de la mezcla, las características sensoriales de la guayaba resaltan, lo que puede influenciar el aumento en la aceptación.

También se destaca que después de la fermentación se reduce el porcentaje de consumidores que no expresan una decisión (ni me gusta, ni me disgusta) y de los que expresan desagrado por el producto fermentado. Solo la pulpa fermentada con el cultivo simple 1 (cepa *Lactobacillus acidophilus*) presenta un pequeño aumento en el porcentaje de consumidores a los que les disgusta.



(A) Mezcla roja: Sin fermentar (■) Cultivos: Mixto 1 (■), Mixto 2 (■), Simple 1 (■). Mezcla amarilla: Sin fermentar (■) Cultivos: Mixto 1 (■), Mixto 2 (■), Simple 1 (■).



(C) Mezcla verde: Sin fermentar (■) Cultivos: Mixto 2 (■), Simple 1 (■).

Figura 6.7: Análisis sensorial de mezclas sin fermentar y fermentadas con varios cultivos. (A) Mezcla roja, (B) Mezcla amarilla (C) Mezcla verde.

Para la mezcla amarilla el porcentaje de aceptación aumenta ligeramente cuando se fermenta con los cultivos mixtos. Cuando se emplea el cultivo simple 1, el sabor ácido es muy alto por lo cual la aceptación desciende un poco (78%). En las mezclas fermentadas

se observa que cuando el porcentaje de consumidores que expresan agrado disminuye, aumenta el porcentaje de los que no expresa ni agrado ni desagrado. El puntaje obtenido para la mezcla antes y después de la fermentación se mantiene cuando se emplea el cultivo mixto 1.

Para la mezcla verde el proceso de fermentación favorece la aceptación de la pulpa, en especial cuando se realiza con el cultivo simple 1, pero el porcentaje de consumidores que expresa agrado por la mezcla es bajo: 56% cuando se fermenta la mezcla con el cultivo mixto 2 y 60% cuando se emplea el cultivo simple 1. Sin embargo, este aumento no tiene un impacto significativo en la puntuación promedio de las pulpas como puede verse en la Tabla 6-11 y en la Figura 6.7 (D). Como se esperaba por el comportamiento discutido previamente, una de las observaciones más frecuentes dadas por los consumidores está relacionada con el deterioro del color.

Considerando que los resultados obtenidos para el análisis hedónico fueron determinados para mezclas fermentadas con diferentes cultivos por lo que se trata de una variable discreta, se aplicó la prueba de χ^2 , partiendo de la hipótesis nula de que no existe asociación entre la elección del consumidor y el tipo de cultivo empleado.

En todos los casos se encontraron valores de p mayores de 0.05 tanto para el coeficiente de Pearson como para la relación de verosimilitud. Este resultado permite el rechazo de la hipótesis nula, por lo que puede deducirse que el tipo de cultivo empleado está asociado con la decisión de preferencia de los consumidores.

En conclusión, se tiene mayor aceptación para la mezcla amarilla, seguida de la verde y por último, la roja. Adicionalmente, la prueba estadística indica que el consumidor toma la decisión de aceptar o no una mezcla en relación con el cultivo empleado. Los consumidores resaltaron el sabor ácido en las tres mezclas (en especial para la roja y la verde), el cual puede balancearse (mediante el índice de madurez) para que la aceptación de las mezclas aumente. De acuerdo con estos resultados se seleccionó la mezcla amarilla y la fermentación con el cultivo mixto 1 para realizar las pruebas descriptivas.

- *Pruebas descriptivas*

Las pruebas descriptivas se aplicaron en la mezcla amarilla ya que fue la de mejores resultados en las pruebas de aceptación. Adicionalmente se realizaron pruebas descriptivas para las pulpas amarillas fermentadas antes de la mezcla con el fin de identificar los cambios sensoriales en cada una de las pulpas. Los resultados se compararon con los obtenidos previamente en el apartado 5.4 para las pulpas amarillas (ahuyama, mango y mezcla).

Los resultados de la evaluación sensorial de todas las pulpas se recogen en la Tabla 6-12, con el objetivo de comparar los cambios presentados para cada sustrato en las diferentes propiedades evaluadas.

Inicialmente se evaluó la pulpa de ahuyama (Figura 6.8 (A)), posteriormente la pulpa de mango (Figura 6.8 (B)) y finalmente la mezcla (Figura 6.9). Los resultados se presentan en forma de diagrama conocido frecuentemente como QDA (*Quantitative Descriptive Analysis*).

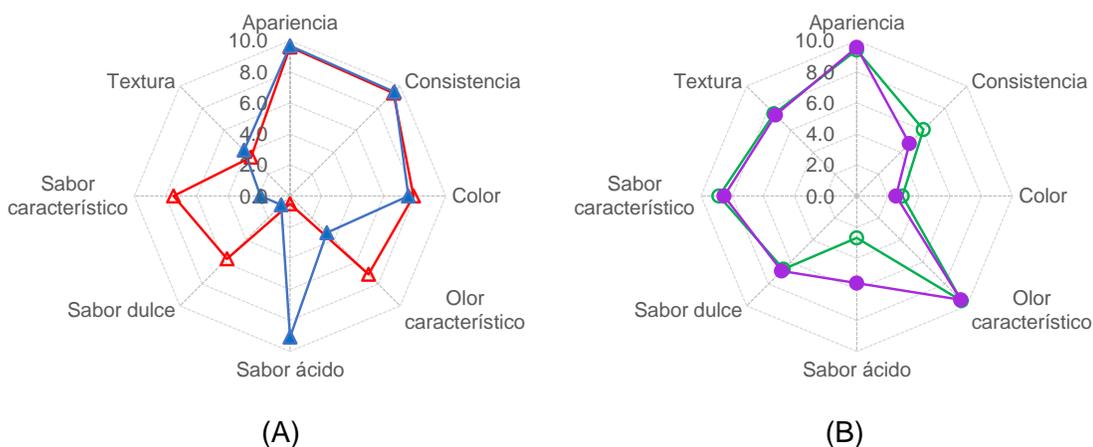
Tabla 6-12. Resultados de la evaluación sensorial de pulpas de ahuyama, mango y mezcla amarilla, antes y después de la fermentación.

Propiedad	Ahuyama sin fermentar	Ahuyama fermentada	Mango sin fermentar	Mango fermentado	Mezcla sin fermentar	Mezcla fermentada
Apariencia	9.60 ± 0.66 ^a	9.68 ± 0.49 ^a	9.41 ± 0.52 ^a	9.57 ± 0.36 ^a	9.22 ± 1.58 ^a	9.50 ± 0.79 ^a
Consistencia	9.38 ± 0.75 ^a	9.48 ± 0.80 ^a	6.05 ± 0.92 ^b	4.78 ± 1.12 ^b	6.07 ± 1.79 ^b	4.89 ± 1.76 ^b
Color	7.93 ± 0.94 ^a	7.58 ± 1.11 ^a	2.93 ± 0.60 ^c	2.52 ± 0.52 ^c	5.15 ± 1.27 ^b	5.88 ± 1.42 ^b
Olor característico	7.13 ± 1.17 ^b	3.33 ± 0.72 ^c	9.51 ± 0.45 ^a	9.45 ± 0.57 ^a	9.09 ± 0.76 ^a	8.93 ± 0.87 ^a
Sabor ácido	0.50 ± 0.55 ^d	9.07 ± 1.15 ^a	2.68 ± 0.48 ^c	5.61 ± 0.59 ^b	2.68 ± 1.28 ^c	5.63 ± 1.51 ^b
Sabor dulce	6.66 ± 0.69 ^b	6.83 ± 0.41 ^c	5.72 ± 1.23 ^{ab}	0.80 ± 0.82 ^{ab}	7.13 ± 1.41 ^a	7.06 ± 1.48 ^a
Sabor característico	7.49 ± 1.10 ^a	1.91 ± 1.41 ^b	8.85 ± 0.66 ^a	8.52 ± 0.66 ^a	8.32 ± 1.67 ^a	8.63 ± 0.94 ^a
Textura	3.55 ± 1.42 ^b	4.18 ± 1.53 ^b	7.51 ± 0.43 ^a	7.38 ± 0.46 ^a	7.77 ± 1.63 ^a	7.42 ± 1.38 ^a

Los valores medios ± SD (n=12) que no comparten una letra, en la misma fila, son significativamente diferentes con un nivel de confianza del 95%.

Las principales diferencias obtenidas para la pulpa de ahuyama debido a la fermentación están en el olor característico y en el sabor (característico, ácido y dulce). Se presenta una reducción del olor y sabor característicos a ahuyama debido al desarrollo de otros aromas por la acción de las bacterias; simultáneamente el sabor ácido aumenta mientras

que el dulce se reduce por la producción de ácido láctico y el consumo de los carbohidratos, respectivamente. En el mango se mantiene el sabor dulce después de la fermentación, la principal diferencia está dada por el sabor ácido, que aumenta con la fermentación.

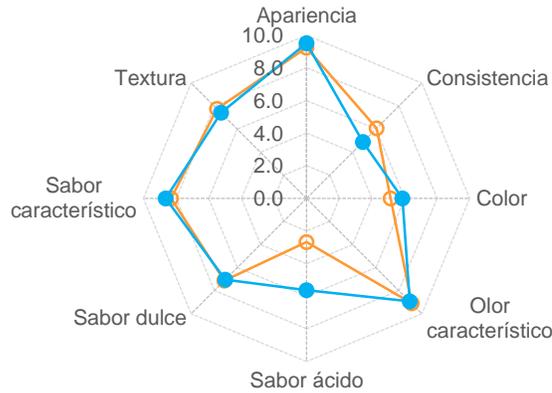


Ahuyama: Sin fermentar (Δ), fermentada (■). Mango: Sin fermentar (○), fermentada (■).

Figura 6.8: Análisis descriptivo (QDA) para las pulpas de ahuyama (A) y mango (B) antes y después de la fermentación.

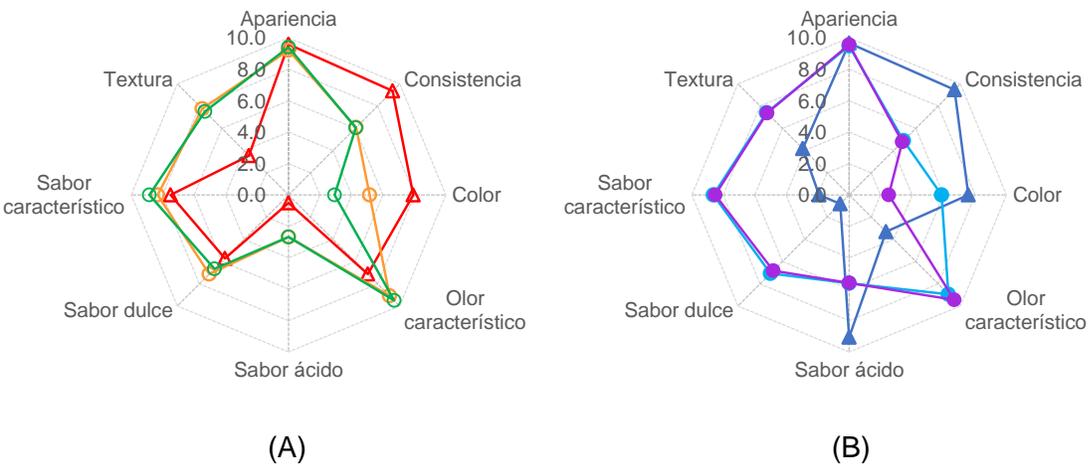
Los cambios más relevantes en la mezcla amarilla observados después de la fermentación (Figura 6.9) son: consistencia más líquida y color ligeramente más amarillo que naranja, pero la mayor diferencia está en el sabor ácido. Las demás características se mantienen: la apariencia y la textura fueron consideradas como adecuadas, sin defectos; la consistencia se valoró como cercana a la de un pudín, el olor y el sabor característicos se cuantificaron como altos y el sabor dulce se valoró en un punto medio.

La Figura 6.10 muestra el análisis descriptivo QDA y permite apreciar los cambios producidos por la mezcla amarilla, antes y después de la fermentación. Se mantiene la similitud entre el perfil sensorial de la mezcla y el mango antes y después de la fermentación, en especial en atributos como consistencia, olor y sabor característicos, sabor dulce y textura, en donde no se observan diferencias significativas entre la pulpa de mango y la mezcla. En ningún caso se observó una diferencia significativa entre los resultados obtenidos para la apariencia de las pulpas.



Mezcla amarilla (Mango – Ahuyama): Sin fermentar (○), fermentada (■).

Figura 6.9: Análisis descriptivo (QDA) para la mezcla amarilla, antes y después de fermentar.



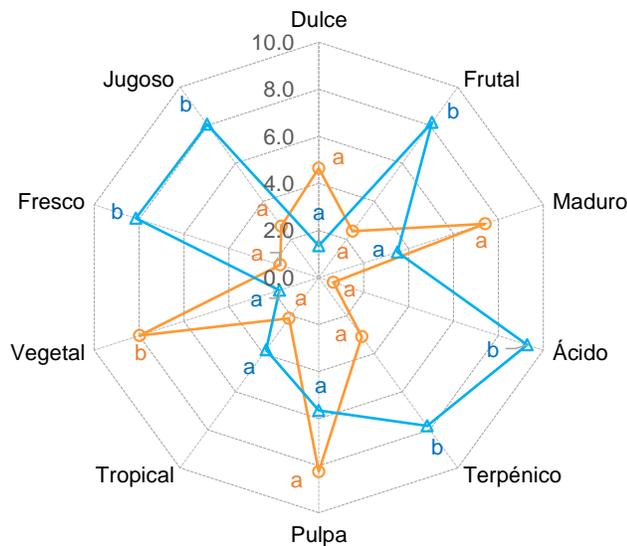
Sin fermentar: Ahuyama (Δ), mango (○) y mezcla (○). Fermentadas: Ahuyama (■), mango (■) y mezcla (■).

Figura 6.10: Análisis descriptivo (QDA) para ahuyama, mango y mezcla, (A) antes y (B) después de la fermentación.

A pesar de que los jueces identificaron un incremento en el sabor ácido en todas las pulpas producido por la fermentación, no reconocieron una reducción en el sabor característico ni en el sabor dulce de la pulpa (en especial para el mango y la mezcla). Por lo tanto, el desarrollo de acidez no ha ocultado las principales características del perfil del sabor.

Teniendo en cuenta los resultados anteriormente discutidos se complementó la evaluación con ayuda de un panel de tres expertos (con experiencia en el diseño de aromas para alimentos), con el fin de identificar cambios más específicos producidos por el proceso fermentativo en el perfil sensorial del a mezcla amarilla. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 6.11.

Se valoraron 10 descriptores diferentes característicos de la pulpa de mango: dulce, frutal, maduro, ácido, terpénico², pulpa, tropical, vegetal, fresco y jugoso. La fermentación produjo una reducción de la sensación vegetal en la mezcla y un aumento significativo en la percepción de los siguientes descriptores: frutal, ácido, terpénico, fresco y jugoso.



Mezcla amarilla (Mango – Ahuyama): Sin fermentar (o), fermentada (Δ). Los valores medios \pm SD ($n=3$) que no comparten una letra, en el mismo descriptor, son significativamente diferentes con un nivel de confianza del 95%

Figura 6.11: Análisis descriptivo (QDA) obtenido por el panel de expertos para la mezcla amarilla antes y después de la fermentación.

² Sensación verde, algo resinosa que recuerda la cáscara de algunos frutales como los cítricos y el mango.

6.2.4 Resultados de otros autores para la fermentación láctica de sustratos similares

Se consultaron diversas fuentes que emplearon la fermentación láctica en diversas frutas y hortalizas para comparar sus resultados con los encontrados en el presente estudio. En la Tabla 6-13 se recopilan los principales aspectos de algunas fuentes seleccionadas.

Tabla 6-13. Reportes de estudios de fermentación láctica en frutas y hortalizas.

Cepas	Condiciones de proceso	Observaciones complementarias	Referencia
<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i>	Sustrato: Remolacha T = 30°C t = 24 h pH = 6.3 Inóculo = 5 – 6 Log UFC/mL	En todos los casos se presentó aumento de acidez y descenso de pH: 3.7 ± 0.0 (<i>L. acidophilus</i>), 5.0 ± 0.1 (<i>L. casei</i>), 5.0 ± 0.0 (<i>L. delbrueckii</i>), 4.1 ± 0.1 (<i>L. plantarum</i>) Concentración final: 27.8 × 10 ⁸ UFC/mL (<i>L. acidophilus</i>), 16.7 × 10 ⁸ UFC/mL (<i>L. casei</i>), 15.3 × 10 ⁸ UFC/mL (<i>L. delbrueckii</i>), 9.2 × 10 ⁸ UFC/mL (<i>L. plantarum</i>)	(Yoon <i>et al.</i> , 2005)
<i>Leuconostoc mesenteroides ssp. Mesenteroides</i>	Sustrato: Zumo y pasta de cebolla, zanahoria y coles T = 26°C t = 14 h pH = 6.0 - 5.8 Inóculo = 7.0 ± 0.9 Log UFC/mL	Se mantuvo el pH constante adicionando KOH y NH ₄ OH. El sustrato se agitó durante la fermentación (60 rpm) Concentración final: 10.1 ± 0.3 Log UFC/mL	(Champagne <i>et al.</i> , 2010)
<i>Weissella cibaria</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus sp.</i> y <i>Lactobacillus pentosus</i>	Sustrato: Smoothies rojo (cerezas, tomates, moras, ciruelas) y verde (kiwi, hinojo, espinaca y papaya) T = 25°C t = 24h pH = 3.50 (rojo); 3.95 (verde) Inóculo = 7.0 Log UFC/g	Se fermentaron muestras control (sin inóculo) que también presentaron crecimiento: 3.1 Log UFC/g (rojo) 2.92 Log UFC/g (verde) Concentración final: 9.50 Log UFC/mL	(Di Cagno <i>et al.</i> , 2011a)
<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Weissella cibaria</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> y <i>Pediococcus pentosaceus</i>	Sustrato: Zumo de granada T = 30°C t = 120 h pH = 3.52 Inóculo = 7.0 ± 0.3 Log UFC/mL	El pH descendió a 3.20 ± 0.02. <i>L. plantarum</i> aislado de tomates mostro mayor crecimiento (7.0 ± 0.3 - 9.0 ± 0.2 Log UFC/mL) Concentración final: 7.3 ± 0.01–7.6 ± 0.03 Log UFC/mL	(Filannino <i>et al.</i> , 2013)

Cepas	Condiciones de proceso	Observaciones complementarias	Referencia
<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> y <i>Lactobacillus casei</i>	Sustrato: Zumo de mango T = 30°C t = 72 h pH = 4.5 Inóculo = 5.0 Log UFC/mL	Se observó reducción del pH con las cuatro cepas (3.5 – 3.0) Concentración final: 1.5 × 10 ⁹ UFC/mL (<i>L. casei</i>) 1.7 × 10 ⁹ UFC/mL (<i>L. acidophilus</i>) 2.0 × 10 ⁹ UFC/mL (<i>L. delbrueckii</i>) 2.2 × 10 ⁹ UFC/mL (<i>L. plantarum</i>)	(Reddy <i>et al.</i> , 2015)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Sustrato: Guayaba T = 37°C t = 16 h pH = 7.05 ± 0.05 Inóculo = 5.0 Log UFC/mL	El sustrato se trató previamente con pectinasa, adición de suplementos (K ₂ HPO ₄ , KH ₂ PO ₄ , MgSO ₄ , NaCl, (NH ₄) ₂ SO ₄ , glicina y sacarosa) y ajuste de pH. El sustrato se agitó durante la fermentación (120 rpm) Concentración final: 7.5 – 9.0 Log UFC/mL	(Bhat <i>et al.</i> , 2015)
<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus spicheri</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i> y <i>Lactobacillus reuteri</i>	Sustrato: Puré de cereza y de brócoli T = 34°C t = 24h pH = 4.01 ± 0.28 (cereza) 6.51 ± 0.03 (brócoli) Inóculo = 8.30 Log UFC/ml	pH final = constante (cereza) y 4.28 - 3.46 (brócoli) Concentración final: 1.0 Log UFC/mL (cereza) 1.5 Log UFC/mL (brócoli)	(Filannino <i>et al.</i> , 2015)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> y <i>Lactobacillus plantarum</i>	Sustrato: Zumo de anacardo T = 30°C t = 48 h pH = 4.0 Inóculo = 9.18 Log UFC/mL	Todas las cepas mostraron una reducción de la concentración de microorganismos viables, una reducción de pH (3.7 – 3.9) y aumento de acidez titulable Concentración final: 6.00 Log UFC/mL	(Kapasob <i>et al.</i> , 2017)
<i>Lactobacillus casei</i>	Sustrato: Bebida de copoazu T = 10 - 41°C t = 24 h pH = 4.29 – 7.11 Inóculo = 8 - 9 Log UFC/mL	Las condiciones de proceso son variables. Concentración final: 8.00 Log UFC/mL	(Pereira <i>et al.</i> , 2017)
<i>Bifidobacterium lactis</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Lactobacillus casei</i> y <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Sustrato: Zumo de albaricoque T = 37°C t = 24 h pH = 6.5 Inóculo = 6.0 Log UFC/mL	Se mantuvieron condiciones anaeróbicas. Se ajustó el pH inicial con NaOH (4N). En todos los casos se presentó reducción del pH (4.8 ± 0.1 – 5.1 ± 0.2) Concentración final: 8.0 Log UFC/mL	(Bujna <i>et al.</i> , 2018)

Como observaciones de las fuentes consultadas se destacan:

- Todos los casos la inoculación se realiza empleando un acondicionamiento previo del cultivo en medio MRS. La concentración de este inóculo es alta (mayor de 6 Log UFC/g o mL) y se adiciona en una proporción que varía del 5 al 10% (p/p) del sustrato.
- En algunos casos se reporta una disminución de las bacterias viables acompañado de un descenso en el pH y aumento en la acidez, razón por la cual puede deducirse que la producción de ácidos orgánicos está asociada con el mantenimiento metabólico de las bacterias.
- Hay estudios en los que se emplean cultivos con cepas mixtas y otros en los que se emplean cepas simples. Así mismo se reportan cepas comerciales como microorganismos aislados en el laboratorio.
- Para algunas fermentaciones se reporta el acondicionamiento del sustrato mediante la adición de nutrientes o ajuste de pH.
- Generalmente la temperatura del proceso fermentativo es menor (25-37°C) a la empleada en este proyecto (42°C), mientras que los tiempos de proceso varían de 16 hasta 120h.
- La mayor parte de las cepas empleadas son de origen vegetal. En ninguno de los casos se emplearon cultivos mixtos de yogurt (*Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii*).
- Son pocos los reportes encontrados para la fermentación de sustratos en los que se combinan frutas y vegetales, lo que remarca el aspecto innovador de los resultados obtenidos.

En el reporte de Di Cagno (Di Cagno et al., 2011a) de destaca adicionalmente: (1) utilización de bacterias lácticas aisladas como parte del mismo trabajo; (2) sólo se incluyeron hortalizas en el batido verde y en una baja proporción (hinojo 7% p/p y espinaca 8% p/p); (3) se empleó el modelo de Gompertz para encontrar los parámetros de las cinéticas de crecimiento; (4) se presentó descenso de °Bx, pH y glucosa, aumento de acidez titulable y de ácido láctico; (5) se evaluaron algunas propiedades durante el almacenamiento (4°C), encontrando disminución en la actividad antioxidante; (6) se realizó un análisis sensorial con un panel de 10 jueces no entrenados para comparar muestras fermentadas con diferentes inóculos.

Como conclusiones del capítulo se tienen las siguientes:

- Bajo las condiciones de los ensayos realizados se descartaron como procesos previos a la fermentación la neutralización y el acondicionamiento del cultivo, debido a que no se presentó un efecto positivo sobre el crecimiento de las bacterias inoculadas. Se resalta que en la neutralización se presentó un deterioro de las propiedades sensoriales y en el caso del acondicionamiento se favorece la acidificación cuando se emplean bebidas de soya o avena.
- Al realizar la fermentación empleando cultivos con una composición diferente (adicionando las cepas *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium lactis*) se obtienen resultados similares, mientras que al inocular las cepas simples solo crece la cepa de *Lactobacillus acidophilus*.
- Se observó un aumento en la aceptabilidad de las mezclas después de la fermentación, especialmente en la roja y la verde. Lo mismo ocurre al emplear los cultivos mixtos en comparación con los cultivos simples.
- El panel semi-entrenado identificó como la principal diferencia debidas a la fermentación el sabor ácido, mientras que el panel de expertos logró detectar diferencias más específicas en el perfil del aroma de las mezclas.
- La revisión de los resultados obtenidos por otros investigadores demuestran el interés científico en el marco de esta investigación. Las condiciones de proceso empleadas en estas referencias son diferentes a las de este proyecto (baja temperatura, tiempos prolongados), debido fundamentalmente al cultivo empleado. En consecuencia, los resultados obtenidos en los productos fermentados también difieren (descenso de pH y de bacterias viables). Muchas de las fuentes reportadas emplean bacterias no comerciales lo cual dificulta su aplicación, escalamiento y aumenta el riesgo de contaminación. Se tienen pocas referencias en las que el sustrato sea una mezcla de frutas y hortalizas. Este aspecto hace que sobresalgan los resultados obtenidos en el presente proyecto.

7. Estudio cinético de fermentación

Con el objetivo de evaluar el comportamiento de las bacterias inoculadas en la mezcla amarilla y obtener parámetros de ajuste de modelos que permitan describir esta pauta, se realizó el seguimiento del crecimiento de las bacterias lácticas a lo largo del proceso fermentativo. Este crecimiento se determinó por conteo en placa (ver apartado 3.2.1).

Para el modelamiento del crecimiento bacteriano se consideraron los modelos de la ecuación logística, de Monod y de Gompertz. Los parámetros de los modelos fueron obtenidos empleando las ecuaciones integradas (Tabla 7-1) y las siguientes consideraciones:

- Límites de integración: $C = C_0$, Concentración de biomasa inicial a $t = 0$.
- La composición de las bacterias lácticas empleadas es constante.
- El efecto de inhibición por sustrato es despreciable.
- El rendimiento del proceso (biomasa/sustrato - Y_{xs}) es constante a lo largo del proceso.

Todos los ajustes de los datos experimentales a los modelos considerados se realizaron mediante la minimización de la sumatoria del cuadrado de las diferencias.

Tabla 7-1. Modelos matemáticos considerados para la cinética del crecimiento microbiano.

Modelos de crecimiento microbiano	Ecuación integrada
Ecuación logística $\frac{dC_x}{dt} = \mu C_x \left[1 - \frac{C_x}{C_{xmax}} \right]$	$C_x = \frac{C_{xmax}}{1 - \left(1 - \frac{C_{xmax}}{C_0} \right) \cdot \exp(-\mu t)}$
Monod $\frac{dC_x}{dt} = \frac{\mu C_s}{K_s + C_s} C_x$	$\mu_{max} t = \left(\frac{K_s}{S_0 + \frac{1}{Y_{xs}} \cdot C_0} + 1 \right) \cdot \ln \left(\frac{C}{C_0} \right) - \left(\frac{K_s}{S_0 + \frac{1}{Y_{xs}} \cdot C_0} \right) \cdot \ln \left(\frac{S}{S_0} \right)$
M'Kendrick y Pai $\frac{dC_x}{dt} = -Y_{xs} \frac{dC_s}{dt}$	$S = S_0 - \frac{1}{Y_{xs}} (C - C_0)$

Modelos de crecimiento microbiano	Ecuación integrada
Gompertz $\frac{dC_x}{dt} = kC_x \ln\left(\frac{C_{xmax}}{C}\right)$	$C_x = C_{xmax} \exp\left[\ln\left(\frac{C_0}{C_{xmax}}\right) \cdot \exp(-kt)\right]$

Dónde:

C_x : concentración de biomasa.

C_{xmax} : concentración de biomasa máxima.

C_s : concentración de sustrato.

μ : velocidad específica de crecimiento.

K_s : constante de saturación

Y_{xs} : rendimiento biomasa / sustrato (UFC/g sustrato)

k : parámetro del modelo.

De forma simultánea se realizó el seguimiento a las propiedades bioactivas de los sustratos con el fin de verificar si se presentan cambios o no, debidos a la fermentación láctica. De presentarse cambios, se tiene como objetivo la identificación de una pauta para los mismos que permita determinar la correlación de los resultados obtenidos por las diversas técnicas de análisis. Para ello se determinó la actividad antirradicalaria empleando las técnicas del apartado 3.2.4 y el análisis estadístico del apartado 3.4.1.

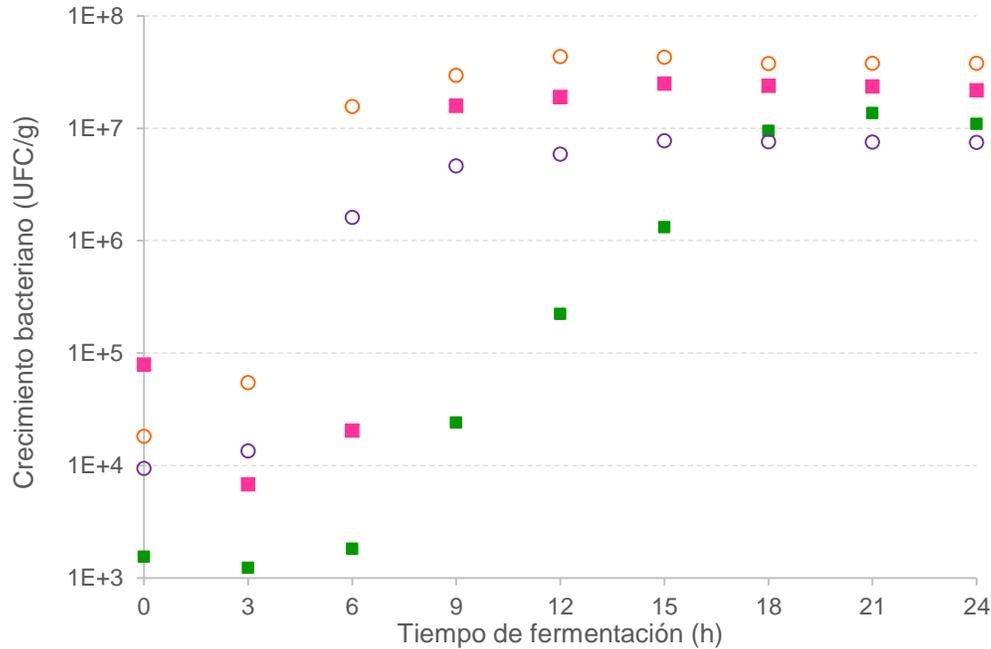
Para complementar los resultados y compararlos con otros sustratos se incluyeron las pulpas de ahuyama, remolacha y la mezcla roja en el diseño experimental. A pesar de que su aceptabilidad es menor, presentaron cambios significativos en las propiedades fisicoquímicas como producto de la actividad microbiológica y resultados muy interesantes en la capacidad antirradicalaria.

7.1 Cinéticas crecimiento

En la Figura 7.1 se presentan los resultados del seguimiento del crecimiento bacteriano de los diferentes sustratos: mezclas amarilla y roja y pulpas de ahuyama y remolacha. Se observa que el comportamiento para el crecimiento de las bacterias es diferente para cada sustrato.

Para las pulpas de hortalizas la fase que está relacionada con la adaptación de los microorganismos al medio (fase lag) es de tres horas aproximadamente y en el caso de la ahuyama se observa crecimiento incluso en este tiempo de proceso. La fase de crecimiento exponencial llega hasta la séptima hora de proceso en los dos casos, pero la

concentración máxima de microorganismos es mayor para la pulpa de ahuyama (5.0×10^7 UFC/g) que para la de remolacha (9.0×10^6 UFC/g). Estas diferencias pueden deberse tanto a las propiedades del sustrato, como a la cantidad de concentración inicial de microorganismos. Posteriormente se puede ver una fase estacionaria que llega hasta las 24 horas del seguimiento del proceso. Sin embargo, durante la fase estacionaria se observa una pequeña disminución de las bacterias viables.



Sustratos: Ahuyama (○), mezcla amarilla (■), remolacha (○) y mezcla roja (■).

Figura 7.1: Crecimiento de las bacterias lácticas inoculadas en diferentes sustratos durante la fermentación.

Para la mezcla roja la fase lag dura aproximadamente 5 horas, incluso se observa una disminución importante en las bacterias viables durante las 3 primeras horas del proceso, que se debe a que los microorganismos se están adaptando a las condiciones del sustrato. La fase de crecimiento exponencial llega hasta la novena hora de fermentación y a partir de este momento se observa una fase estacionaria, y al igual que en el caso de las hortalizas, con una pequeña disminución en las bacterias viables.

La duración de la fase lag también depende de la concentración inicial de microorganismos (nivel de inoculación). Si la concentración es alta, la duración de esta fase es menor. En el caso de la mezcla amarilla la fase lag llega hasta la sexta hora de

fermentación, mientras que la fase de crecimiento exponencial puede extenderse hasta las 24 horas de proceso. A pesar de que todas las fases son más prolongadas, la máxima concentración de los microorganismos es superior a la de los otros sustratos (aunque no se realizó un seguimiento por un tiempo mayor a las 24 horas de fermentación). Ya que la concentración mínima de microorganismos para que un alimento sea funcional es de 1×10^6 UFC/g, todas las pulpas fermentadas pueden considerarse como alimentos funcionales.

Los resultados para el modelamiento de las cinéticas de crecimiento en la mezcla amarilla y en la pulpa de ahuyama se presentan en la Figura 7.2 y en la Tabla 7-2. Se observa que el ajuste de los datos experimentales a los diferentes modelos cinéticos depende del sustrato fermentado.

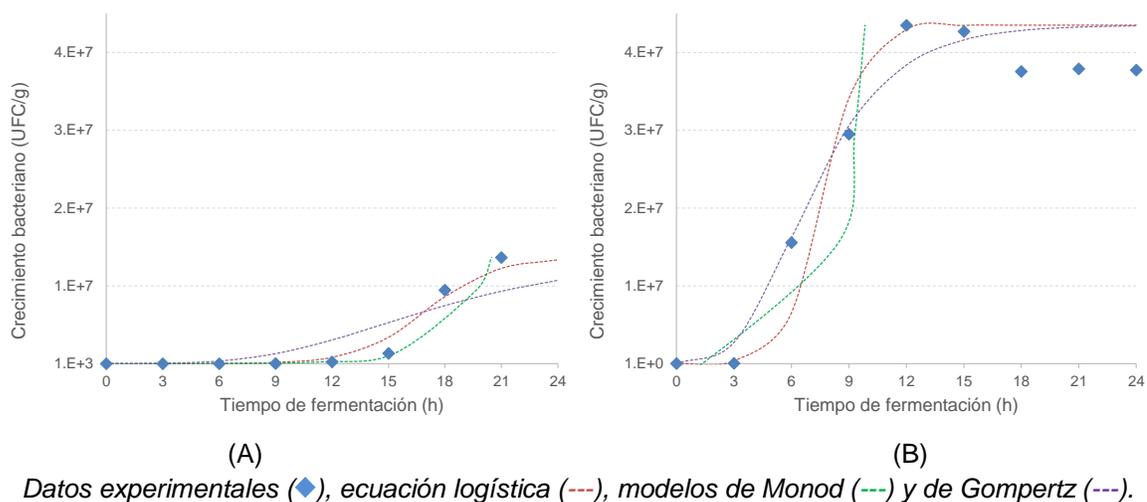


Figura 7.2: Ajuste de modelos cinéticos para el crecimiento bacteriano en (A) la mezcla amarilla y (B) en la pulpa de ahuyama.

Para la mezcla amarilla se observa que el modelo que presenta mayor coeficiente de correlación con los datos experimentales (mejor ajuste) es el de la ecuación logística ($R^2 = 0.952$), seguido del modelo de Monod ($R^2 = 0.947$), mientras que el de Gompertz no presenta un coeficiente alto de correlación ($R^2 = 0.842$).

Tal como se mencionaba anteriormente, la fase lag es mucho más prolongada para la mezcla (6h) en comparación con la pulpa de ahuyama (3h). Esto se debe a que el contenido de mango en la mezcla amarilla es alto (80%), lo cual implica que el pH es más

ácido y en consecuencia las bacterias lácticas inoculadas tardan más tiempo en adaptarse al medio.

Tabla 7-2. Ajuste experimental de modelos cinéticos para la fermentación de mezcla amarilla y pulpa de ahuyama.

Parámetros	Mezcla amarilla (Mg-Ay)			Ahuyama (Ay)		
	Ecuación logística	Monod	Gompertz	Ecuación logística	Monod	Gompertz
C_{x0} : concentración de biomasa inicial	1.23 x 10 ³			1.83 x 10 ⁴		
$C_{x\max}$: concentración de biomasa máxima	1.36 x 10 ⁷			4.35 x 10 ⁷		
C_{s0} : concentración de sustrato inicial	----	0.0844	----	----	0.0221	----
μ_m : velocidad máxima de crecimiento	0.547	0.861	----	1.007	1.883	----
K_s : constante de saturación	----	0.0753	----	----	0.0298	----
Y_{xs} : rendimiento	----	1.0 x 10 ¹⁰	----	----	1.0 x 10 ¹⁰	----
k: parámetro del modelo	----	----	0.1524	----	----	0.3438
R^2 : coeficiente de correlación	0.952	0.947	0.842	0.954	0.858	0.989

En correspondencia con lo anterior, la velocidad máxima de crecimiento es menor en la mezcla que en la ahuyama, en todos los modelos ajustados. Este comportamiento hace evidente que para poder evaluar todas las fases de crecimiento de las bacterias lácticas en la mezcla es necesario hacer un seguimiento más prolongado.

Es posible que por esta razón el modelo de Monod ajuste mejor (mayor coeficiente de correlación con los datos experimentales), en relación con los otros, ya que no se cuenta con los datos suficientes para realizar el ajuste durante la fase estacionaria. Es importante destacar que este seguimiento es de interés desde el punto de vista científico. Sin embargo, desde el punto de vista práctico no se recomienda que la fermentación dure más de las 24 horas, ya que el desarrollo de acidez puede ser excesivo y perjudicar la aceptabilidad del producto.

Para el caso de la ahuyama el comportamiento es muy diferente y, en consecuencia, el ajuste de los datos experimentales también. Los modelos que mejor se ajustan al comportamiento de los datos experimentales son el de Gompertz ($R^2 = 0.989$) y en segundo lugar el de la ecuación logística ($R^2 = 0.954$). Se obtuvo un crecimiento

bacteriano muy alto en la hora 12 de fermentación (5.84×10^7 UFC/g), que no fue considerado en el modelamiento para mejorar el ajuste.

Al ajustar el modelo de Monod a los datos experimentales no se obtuvo un coeficiente de correlación adecuado (0.85). Para analizar este resultado se deben tener en cuenta algunas consideraciones para el ajuste del modelo. Por ejemplo, el valor del rendimiento o el valor de la velocidad máxima de crecimiento; pero, sin duda, la principal razón por la cual el modelo de Monod no se ajusta adecuadamente, a pesar de que se emplea frecuentemente para la descripción matemática del crecimiento bacteriano, es porque para esta fermentación el crecimiento microbiano no depende de los carbohidratos a los que se les hizo seguimiento; es decir, los azúcares no son el sustrato limitante del crecimiento.

Los resultados para la mezcla roja y para la pulpa de remolacha se presentan en la Figura 7.3 y en la Tabla 7-3. Se puede ver que los modelos de la ecuación logística y de Gompertz ajustan mejor en comparación con la ecuación de Monod, tanto para la mezcla roja como para la pulpa de remolacha.

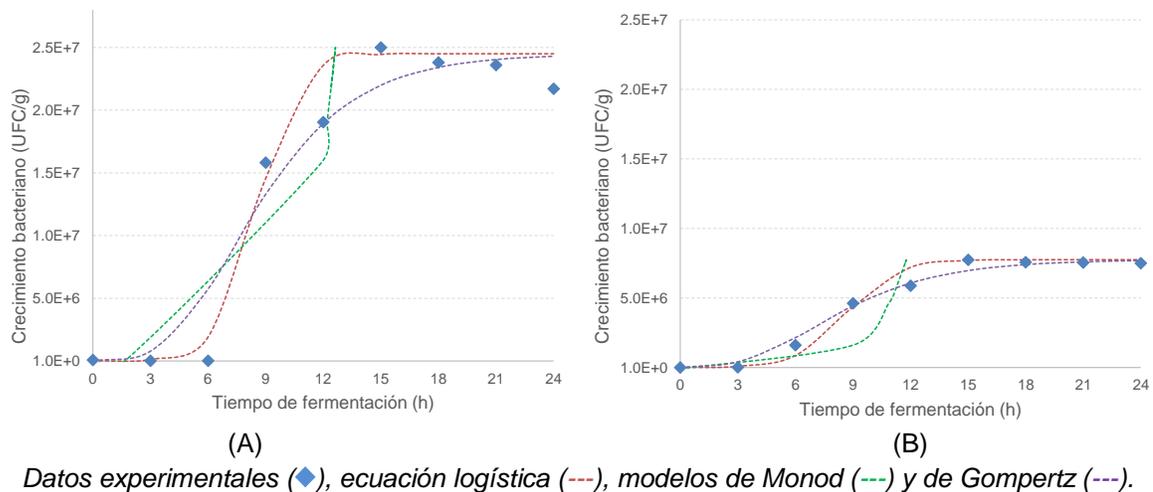


Figura 7.3. Ajuste de modelos cinéticos para el crecimiento bacteriano en la mezcla roja (A) y en la pulpa de remolacha (B).

Tabla 7-3. Ajuste experimental de modelos cinéticos para la fermentación de mezcla roja y pulpa de remolacha.

Parámetros	Mezcla roja (Gy-Rm)			Remolacha (Rm)		
	Ecuación logística	Monod	Gompertz	Ecuación logística	Monod	Gompertz
C _{x0} : concentración de biomasa inicial	6.82 x 10 ³			9.45 x 10 ³		
C _{xmax} : concentración de biomasa máxima	2.45 x 10 ⁷			7.75 x 10 ⁶		
C _{s0} : concentración de sustrato inicial	----	0.0469	----	----	0.0545	----
μ _m : velocidad máxima de crecimiento	0.952	2.217	----	0.773	0.973	----
K _s : constante de saturación	----	0.113	----	----	0.039	----
Y _{xs} : rendimiento	----	1.0 x 10 ¹⁰	----	----	1.0 x 10 ¹⁰	----
k: parámetro del modelo	----	----	0.2882	----	----	0.2760
R ² : coeficiente de correlación	0.968	0.811	0.944	0.979	0.822	0.989

Para la mezcla roja se observa una mayor duración de la fase lag y mayores valores para el crecimiento bacteriano frente a los valores obtenidos para la pulpa de remolacha, tal como se discutió anteriormente. Adicionalmente se observa un crecimiento exponencial y máximo de la hora 6 a la hora 9. Por ello se obtiene un mejor ajuste al modelo de la ecuación logística ($R^2 = 0.97$). Luego de la hora 15 de fermentación, se presenta una pequeña disminución en el conteo bacteriano, que se aleja de los modelos ajustados, debido principalmente a que éstos han sido propuestos para describir principalmente las fases lag y de crecimiento.

Durante la fermentación de pulpa de remolacha se obtuvo un crecimiento bacteriano muy alto en la hora 15 de fermentación (1.12×10^7 UFC/g) para uno de los ensayos de fermentación, al descartar éste punto se obtuvieron coeficientes de correlación (R^2) altos: 0.979 cuando se ajusta el modelo de la ecuación logística y 0.989 para el modelo de Gompertz.

Al comparar la velocidad máxima obtenida para la ecuación cinética para los dos sustratos y en los dos modelos se observan valores mayores para la mezcla roja que para la pulpa de remolacha, lo cual es contradictorio con lo esperado ya que el pH de la

hortaliza es más neutro que el de la mezcla. Así mismo, la constante de saturación (K_s) es mucho menor para la hortaliza que para la mezcla. Sin embargo, para el modelo de Gompertz el parámetro k es similar para los dos sustratos.

Para el caso de la ahuyama los modelos que mejor se ajustan al comportamiento de los datos experimentales son el de Gompertz ($R^2 = 0.989$) y en segundo lugar el de la ecuación logística ($R^2 = 0.954$). Este comportamiento es similar al encontrado para las pulpas rojas (mezcla y hortaliza) que se discutió anteriormente. Al igual que para la remolacha, durante la fermentación de pulpa de ahuyama se obtuvo un crecimiento bacteriano muy alto en la hora 12 de fermentación (5.84×10^7 UFC/g), el cual fue descartado para mejorar el ajuste de los modelos.

En el caso de la mezcla amarilla (mango – ahuyama) el comportamiento es muy diferente y, en consecuencia, el ajuste de los datos experimentales también. Se observa que el modelo que mejor ajusta es el de la ecuación logística ($R^2 = 0.952$), seguido del modelo de Monod ($R^2 = 0.947$), mientras que el de Gompertz no presenta un coeficiente alto de correlación ($R^2 = 0.842$).

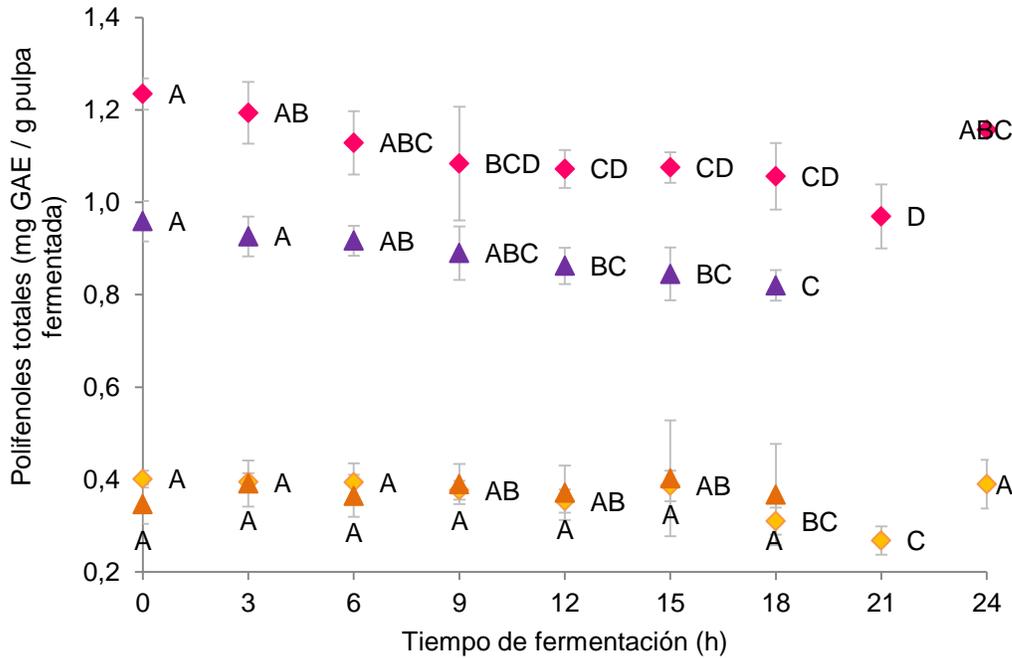
7.2 Evaluación de actividad antirradicalaria

Para determinar el efecto de la fermentación sobre la actividad antirradicalaria se realizó el seguimiento durante el proceso fermentativo empleando diferentes técnicas analíticas (detalladas en el apartado 3.2.3). Los resultados para el contenido de polifenoles totales se presentan en la Figura 7.3.

Durante la fermentación de la pulpa de remolacha se observa una reducción significativa en el contenido de polifenoles totales con una tendencia lineal. El valor del contenido de polifenoles totales después de las 18 horas de fermentación es 85% menor que el valor inicial.

En la mezcla roja los polifenoles aumentan (aproximadamente un 20% en relación con la remolacha) debido a la adición de la guayaba. El comportamiento observado durante el proceso fermentativo es similar a la remolacha: se presenta un descenso con una tendencia lineal proporcional al tiempo de fermentación. En este caso las diferencias

presentadas al inicio y al final de la fermentación son significativas, y el valor obtenido después de 21 horas de proceso es aproximadamente un 80% del valor inicial.



Remolacha: (▲); mezcla roja (◆); ahuyama: (▲); mezcla amarilla: (◆).

Figura 7.3: Contenido de polifenoles totales en las pulpas rojas (A) y amarillas (B) durante el proceso fermentativo.

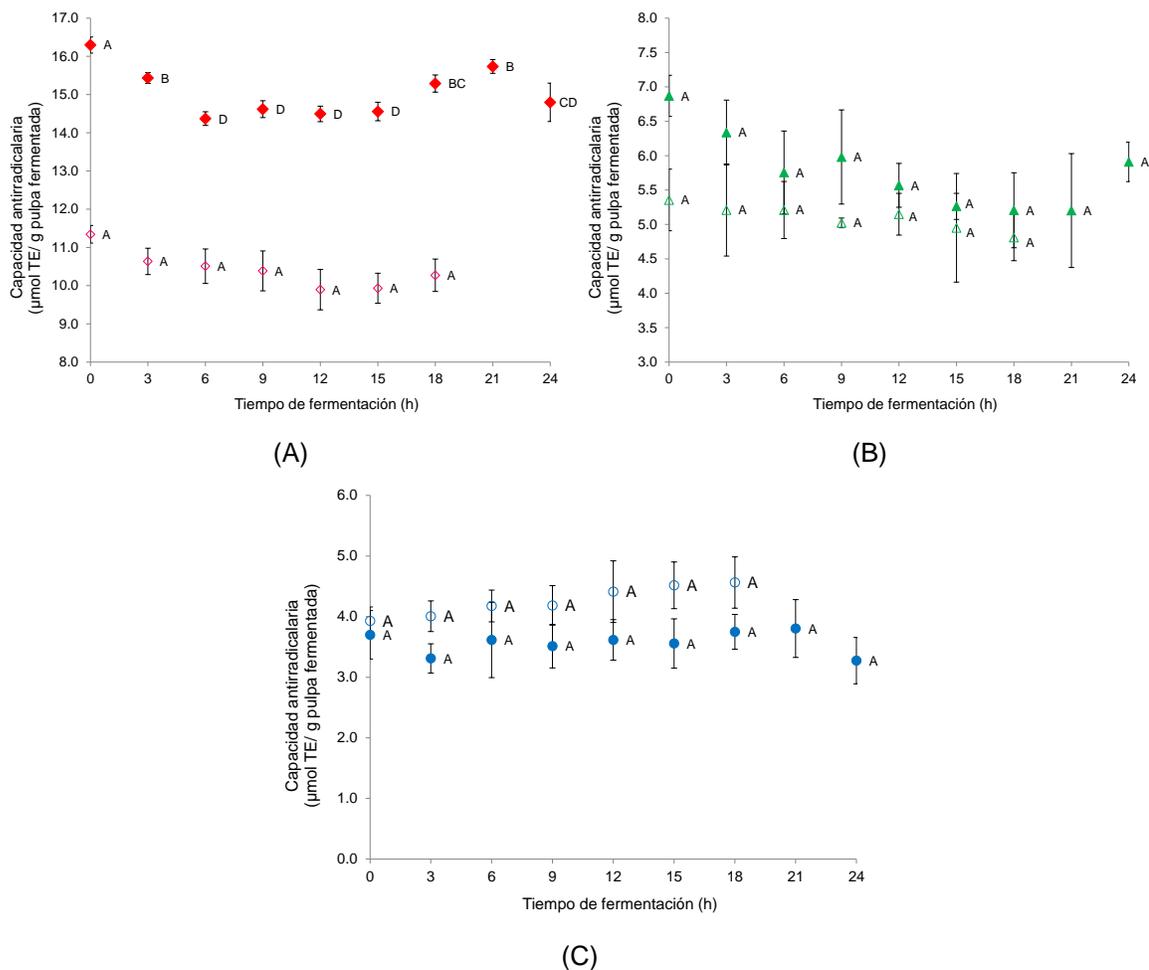
En la ahuyama no se observan variaciones significativas en el contenido de polifenoles totales a lo largo de las 18 horas de fermentación. La adición de esta pulpa no afecta de manera significativa los niveles de polifenoles en la mezcla amarilla. Sin embargo, después de las 15 horas de fermentación, la reducción en la mezcla resulta significativa en relación con los valores iniciales (aproximadamente del 65% del valor inicial).

También se realizaron determinaciones de la actividad antirradicalaria a lo largo del proceso fermentativo aplicando las técnicas analíticas detalladas en el apartado 3.2.3. Los resultados para la pulpa de remolacha y la mezcla roja se muestran en la Figura 7.4.

De acuerdo con la técnica analítica empleada en la pulpa de remolacha y la mezcla roja puede verse que:

- DPPH: no se presentan diferencias significativas en la capacidad antirradicalaria de la remolacha durante la fermentación. En la mezcla estos valores aumentan

significativamente, así como las diferencias producidas por la fermentación, en especial por la reducción que se presenta en las seis primeras horas de proceso. Después de la hora 18 los valores aumentan levemente. Este comportamiento indica que los compuestos con actividad antirradicalaria aportados por la guayaba son más sensibles al proceso.



Remolacha: DPPH (◊), ABTS (○), FRAP (△). Mezcla roja: DPPH (◆), ABTS (●), FRAP (▲).

Los valores medios \pm SD ($n=3$) que no comparten una letra, en la misma serie de datos (dentro del mismo sustrato), son significativamente diferentes con un nivel de confianza del 95%.

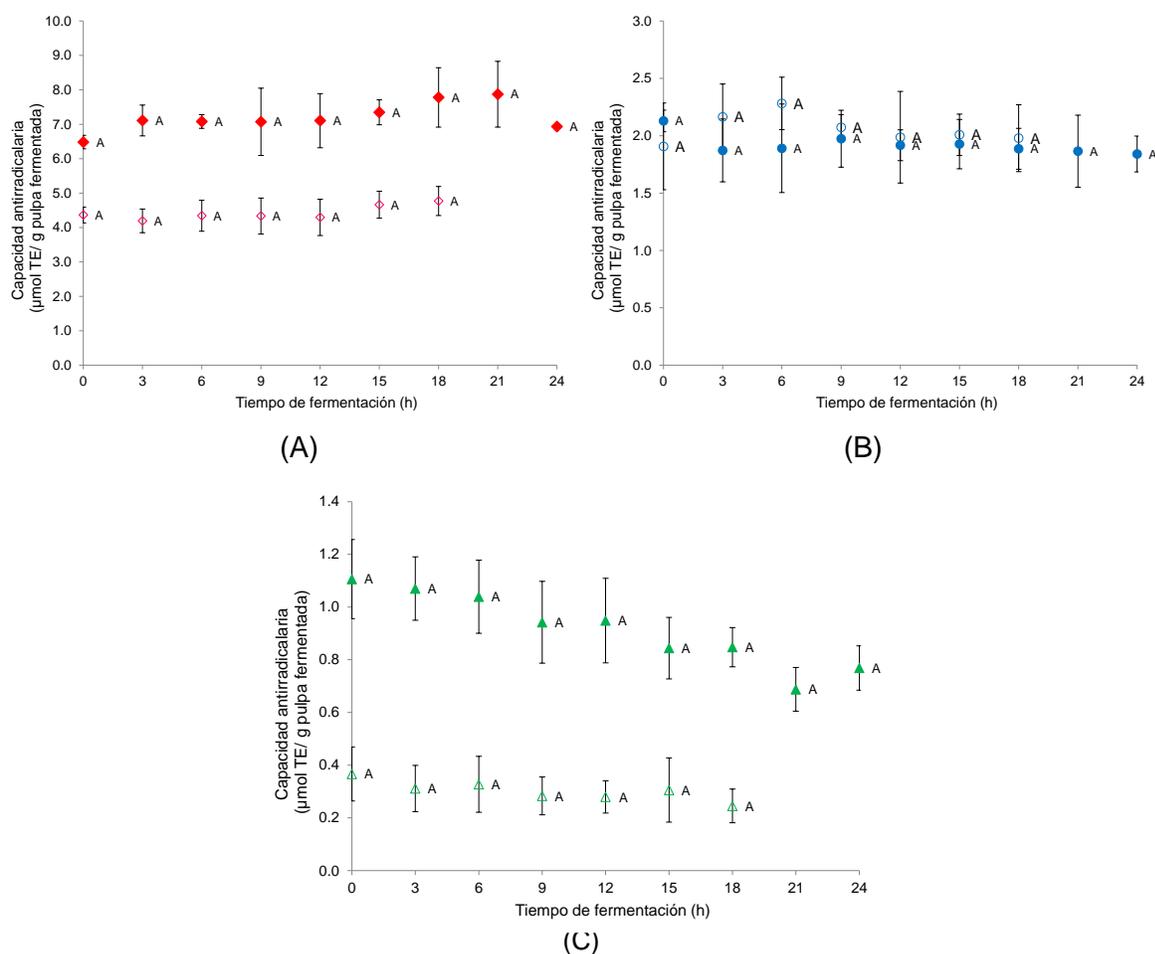
Figura 7.4: Capacidad antirradicalaria de las pulpas rojas durante la fermentación.

Adicionalmente, esta dinámica puede presentarse como parte de la acción bacteriana así: inicialmente los microorganismos pueden consumir parte de los antioxidantes para adaptarse al medio. Durante la fase de crecimiento exponencial la capacidad antioxidante permanece estable y posteriormente, durante la fase estacionaria, el ácido láctico

producido favorece la liberación de algunos compuestos con capacidad antirradicalaria presentes en las paredes celulares del sustrato.

- ABTS Y FRAP: no se observan diferencias significativas a lo largo del proceso fermentativo. Sin embargo, los valores de capacidad antioxidante encontrados mediante FRAP para la remolacha son menores que para la mezcla.

Los resultados de la evaluación de la capacidad antirradicalaria en la pulpa de ahuyama y la mezcla amarilla se muestran en la Figura 7.5. En ninguna de las técnicas (DPPH, ABTS, o FRAP) se presentaron diferencias significativas debidas a la fermentación durante las 24 horas de proceso.



Ahuyama: DPPH (◇), ABTS (○), FRAP (△). Mezcla amarilla: DPPH (◆), ABTS (●), FRAP (▲).

Los valores medios \pm SD ($n=3$) que no comparten una letra, en la misma serie de datos (dentro del mismo sustrato), son significativamente diferentes con un nivel de confianza del 95%.

Figura 7.5: Capacidad antioxidante de las pulpas amarillas durante la fermentación.

Sin embargo, se encuentran diferentes valores de capacidad antirradicalaria de acuerdo con la técnica analítica empleada, de mayor a menor se tienen: DPPH, ABTS Y FRAP. Así mismo, al utilizar DPPH y FRAP se presentan valores mayores para la mezcla en comparación con los obtenidos en la pulpa de ahuyama, originados fundamentalmente por la adición de la pulpa de fruta. Estas diferencias no se perciben cuando se emplea ABTS.

Para poder comparar los niveles de polifenoles extraídos con otros alimentos que son reconocidos como una buena fuente de antioxidantes en la dieta, es indispensable considerar las porciones que una persona podrían consumir normalmente cada día (considerando una dieta promedio de 2000 kcal). Para ello, se recopilaron algunos de los resultados obtenidos previamente dentro del grupo de investigación, los cuales se muestran en la Tabla 7-3.

Tabla 7-3. Contenido de polifenoles consumidos diariamente en diferentes alimentos

Alimento	Polifenoles totales (Folin – Ciocalcetau)	Referencia	Porción diaria	Polifenoles en la porción ³
Nueces	22.95 ± 0.04 (mg GAE/ g muestra fresca y desengrasada)	(Villasante <i>et al.</i> , 2019)	20g	172.1 (mg GAE / día)
Jamaica	22.40 ± 0.02 (mg GAE/ g muestra fresca)		150mL de infusión	400.0 (mg GAE / día)
Té verde	2083 ± 51.3 (mg GAE/ L infusión)	(Almajano <i>et al.</i> , 2008)	150mL de infusión	312.5 (mg GAE / día)
Cebolla	6.31 ± 0.21 (mg GAE/ g muestra seca)	(Santas <i>et al.</i> , 2008)	10g	6.9 (mg GAE / día)
Romero	219 ± 6.1 (mg GAE/ g extracto liofilizado)	(Gabriela <i>et al.</i> , 2016)	150mL de infusión	8.2 (mg GAE / día)
Tomillo	334 ± 18.4 (mg GAE/g extracto liofilizado)			12.5 (mg GAE / día)
Remolacha ⁴	0.82 ± 0.02 (mg GAE/ g pulpa)	Presente trabajo	200g	164.0 (mg GAE / día)
Mezcla roja ⁷	0.37 ± 0.02 (mg GAE/ g pulpa)			193.8 (mg GAE / día)
Ahuyama ⁷	0.97 ± 0.03 (mg GAE/ g pulpa)			73.4 (mg GAE / día)
Mezcla amarilla ⁷	0.27 ± 0.01 (mg GAE/ g pulpa)			53.6 (mg GAE / día)

³ Calculado a partir de: porcentaje de grasa en la nuez: 62,5%; humedad de la flor de Jamaica: 86%, peso promedio de una bolsa de té: 2,5g; porcentaje de humedad en la cebolla: 89%; porcentaje de extracto en la planta: 1,5%.

⁴ Pulpas de hortalizas y mezclas fermentadas después de 18 y 21 horas de proceso, respectivamente.

Teniendo en cuenta estos resultados se puede ver que los polifenoles consumidos en una porción de pulpa de remolacha o de mezcla roja fermentadas son similares a los obtenidos en una porción de nueces y casi la mitad de los contenidos en una infusión de flor de Jamaica o de té verde.

En las pulpas amarillas el aporte de polifenoles alcanzado es aproximadamente la mitad del obtenido para las pulpas rojas. Tanto para las pulpas amarillas como para las rojas el aporte diario es muy alto frente al consumo de otros alimentos reconocidos por su actividad antioxidante como la cebolla, el romero o el tomillo, ya que la porción que se consume de estos alimentos es muy pequeña.

También se compararon los valores de capacidad antirradicalaria determinados por DPPH o ABTS, en las pulpas fermentadas, con otros alimentos. Se calculó la capacidad antioxidante presente en la porción diaria de cada alimento. Los resultados se muestran en la Tabla 7-4. Puede observarse que la ingesta de una porción de pulpas puede proporcionar una cantidad similar de antioxidantes, y en algunos casos, superior a la de otros alimentos como las nueces o hierbas aromáticas (jamaica, romero o tomillo), los cuales generalmente son considerados como una buena fuente de estos compuestos.

Tabla 7-4. Antioxidantes consumidos diariamente en diferentes alimentos.

Alimento	Capacidad antioxidante	Referencia	Porción diaria	Capacidad antioxidante diaria ⁵
Nueces	37.63 ± 1.08 (mg TE/ g muestra seca y desengrasada) (DPPH)	(Villasante <i>et al.</i> , 2019)	20g	239.89 (mg TE / día)
Jamaica	19.69 ± 0.42 (mg TE/ g muestra seca) (DPPH)		150mL de infusion	49.23 (mg TE / día)
Té verde	6344 ± 72.8 (mmol TE/ L infusión) (ABTS)	(Almajano <i>et al.</i> , 2008)	150mL de infusion	238.18 (g TE / día)
Cebolla	77.6 ± 2.17 (µmol TE/ g muestra seca) (ABTS)	(Santas <i>et al.</i> , 2008)	10g	21340 (mg TE / día)
Romero	0.8 ± 0.04 (mmol TE/ g extracto liofilizado) (ABTS)	(Gabriela <i>et al.</i> , 2016)	150mL de infusion	7.5 (mg TE / día)
Tomillo	1.1 ± 0.04 (mmol TE/g extracto liofilizado) (ABTS)			10.31 (mg TE / día)

⁵ Calculado a partir de: contenido de grasa y humedad en la nuez: 62.5% y 15%, respectivamente; humedad de la flor de Jamaica: 86%, peso promedio de una bolsa de té: 2.5g; porcentaje de humedad en la cebolla: 89%; porcentaje de extracto en la planta: 1.5%.

Alimento	Capacidad antioxidante	Referencia	Porción diaria	Capacidad antioxidante diaria ⁵
Remolacha ⁶	10.27 ± 0.42 (μmol TE/g pulpa) (DPPH)	Presente trabajo	200g	514.10 (mg TE / día)
	4.56 ± 0.42 (μmol TE/g pulpa) (ABTS)			228.26 (mg TE / día)
Mezcla roja ⁸	15.74 ± 0.18 (μmol TE/g pulpa) (DPPH)			787.91 (mg TE / día)
	3.80 ± 0.48 (μmol TE/g pulpa) (ABTS)			190.22 (mg TE / día)
Ahuyama ⁸	0.37 ± 0.14 (μmol TE/g pulpa) (DPPH)			18.52 (mg TE / día)
	1.98 ± 0.29 (μmol TE/g pulpa) (ABTS)			99.11 (mg TE / día)
Mezcla amarilla ⁸	6.93 ± 0.03 (μmol TE/g pulpa) (DPPH)			346.90 (mg TE / día)
	1.87 ± 0.31 (μmol TE/g pulpa) (ABTS)			93.61 (mg TE / día)

Se evaluó la correlación entre los métodos analíticos empleados para la determinación de la capacidad antirradicalaria en cada una de las pulpas. Los resultados se pueden ver en la Tabla 7-5. De acuerdo con estos resultados se puede ver que solo unas pocas técnicas están correlacionadas entre sí. Por lo tanto, los resultados obtenidos por cada una de ellas son complementarios.

Tabla 7-5. Coeficiente de correlación entre las técnicas analíticas empleadas para la determinación de la capacidad antirradicalaria de las pulpas.

Técnica analítica	Remolacha	Mezcla roja	Ahuyama	Mezcla amarilla
TPC vs DPPH	0.70	0.06	0.01	0.73
TPC vs ABTS	0.96	0.27	0.05	0.13
TPC vs FRAP	0.85	0.80	0.13	0.47
DPPH vs ABTS	0.71	0.11	0.16	0.38
DPPH vs FRAP	0.45	0.19	0.21	0.49
ABTS vs FRAP	0.73	0.13	0.01	0.32

Se presenta la Tabla 7-6 a manera de resumen y con el fin de comparar los valores de capacidad antirradicalaria obtenidos antes y después de la fermentación. Puede verse:

⁶ Pulpas de hortalizas y mezclas fermentadas después de 18 y 21 horas de proceso.

- Los polifenoles totales en las pulpas rojas (remolacha y mezcla) son significativamente menores que en las pulpas amarillas (ahuyama y mezcla).
- No hay diferencias en los polifenoles de las pulpas amarillas debido a la adición de la fruta a pesar de que la proporción de mango en la mezcla es alta (80% p/p).
- La adición de guayaba aumenta los polifenoles totales de la mezcla, que disminuyen significativamente después de la fermentación.
- Los valores de capacidad antirradicalaria para DPPH en las pulpas rojas son significativamente más altos que en las pulpas amarillas y, en los dos casos, la adición de frutas favorece esta tendencia.
- La capacidad antirradicalaria (con DPPH) en las pulpas amarillas aumenta después de la fermentación, mientras que en las pulpas rojas disminuye. Sin embargo, estas diferencias no son significativas.
- Para ABTS o FRAP los valores de capacidad antirradicalaria de las pulpas amarillas son menores que los de las rojas. Al comparar los valores obtenidos antes y después de la fermentación se observan comportamientos opuestos: con ABTS, se tiene un aumento poco significativo; con FRAP, se presenta una disminución significativa.

Tabla 7-6. Polifenoles totales y capacidad antirradicalaria antes y después de la fermentación de pulpas de hortalizas y mezclas.

Sustrato	Tiempo de fermentación	Polifenoles totales (mg GAE/g pulpa)	Capacidad antioxidante ($\mu\text{mol TE/g pulpa}$)		
		Folin-Ciocalteu	DPPH	ABTS	FRAP
Pulpa de ahuyama	0	0.35 \pm 0.09 ^C	3.64 \pm 2.19 ^{FGHIJ}	1.91 \pm 0.48 ^{JK}	0.37 \pm 0.21 ^K
	9	0.40 \pm 0.19 ^C	4.12 \pm 2.50 ^{FGH}	2.07 \pm 0.26 ^{IJK}	0.28 \pm 0.22 ^K
Mezcla amarilla	0	0.40 \pm 0.02 ^C	6.48 \pm 0.20 ^{DEF}	2.13 \pm 0.09 ^{GHIJK}	1.11 \pm 0.15 ^{JK}
	21	0.27 \pm 0.03 ^C	7.87 \pm 0.96 ^{CD}	1.87 \pm 0.31 ^{HIJK}	0.69 \pm 0.08 ^K
Pulpa de remolacha	0	0.97 \pm 0.13 ^B	11.34 \pm 2.25 ^B	3.93 \pm 1.02 ^{FGHI}	5.36 \pm 1.53 ^{DEF}
	9	0.90 \pm 0.13 ^B	10.39 \pm 1.88 ^{BC}	4.18 \pm 0.82 ^{FGH}	5.02 \pm 0.83 ^{EF}
Mezcla roja	0	1.24 \pm 0.04 ^A	16.30 \pm 0.21 ^A	3.70 \pm 0.40 ^{FGHIJ}	6.87 \pm 0.30 ^{DE}
	21	0.97 \pm 0.05 ^B	15.74 \pm 0.18 ^A	3.80 \pm 0.48 ^{FGHIJ}	5.20 \pm 1.53 ^{DEFG}

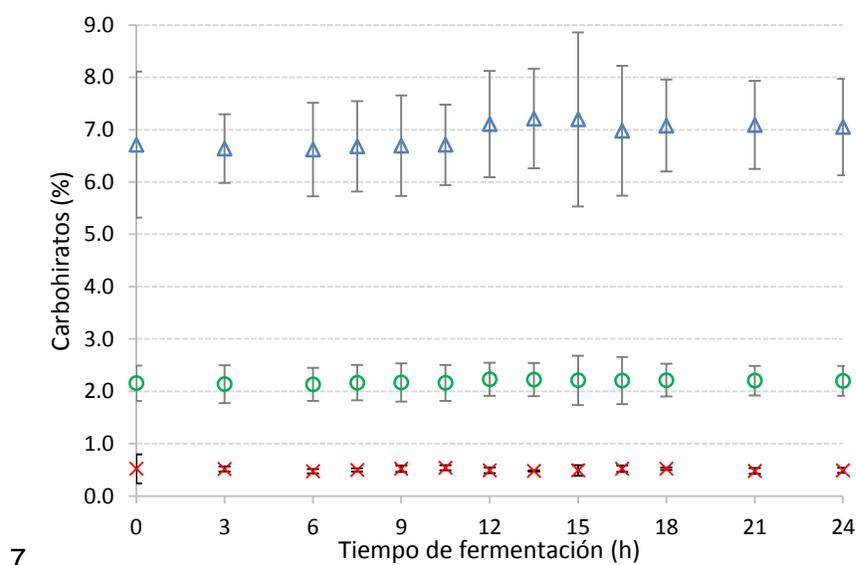
Los valores de polifenoles totales y capacidad antioxidante no son comparables. Los valores medios \pm SD ($n=3$) que no comparten una letra, son significativamente diferentes con un nivel de confianza del 95%.

Tal como se ha discutido, se observan diferencias propias de la técnica aplicada; es decir, los valores encontrados al determinar la capacidad antioxidante mediante DPPH

son mayores que al emplear FRAP y ABTS. Esto se debe principalmente a los diferentes mecanismos con los que funciona cada técnica, ya sea transferencia de electrones y/o de átomos de hidrógeno. Para las técnicas aplicadas, los detalles de los mecanismos de reacción se presentaron anteriormente, en la Tabla 1-3.

7.3 Seguimiento de carbohidratos y ácidos orgánicos

Se realizó el seguimiento de la sacarosa, glucosa y fructosa presentes en la mezcla amarilla, tal como puede verse en la Figura 7.6. En ninguno de los casos se presentó un descenso significativo, a pesar de ser fuentes de carbono disponible para el crecimiento de las bacterias lácticas. En el caso de la sacarosa se observan grandes variaciones, que incluyen un pequeño aumento a partir de la hora 12 de fermentación.



7. Sacarosa (Δ), glucosa (\times), fructosa (\circ).

Figura 7.6: Contenido de carbohidratos en la mezcla amarilla durante la fermentación.

Teniendo en cuenta que se presenta crecimiento de las bacterias inoculadas, este comportamiento en los carbohidratos evaluados sugiere que estas bacterias emplean una fuente de carbono diferente o en cantidades muy pequeñas. Este comportamiento puede presentarse en diferentes bacterias lácticas y está influenciado por las condiciones del sustrato. Por ejemplo, en la fermentación láctica de la bebida de soya las bacterias prefieren los oligosacáridos (rafinosa y estaquiosa) como fuente de carbono en lugar de

sacarosa (Quicazán, 2012). También puede considerarse la presencia de fructooligosacáridos, polisacáridos, pectinas y celulosa (Mussatto and Mancilha, 2007).

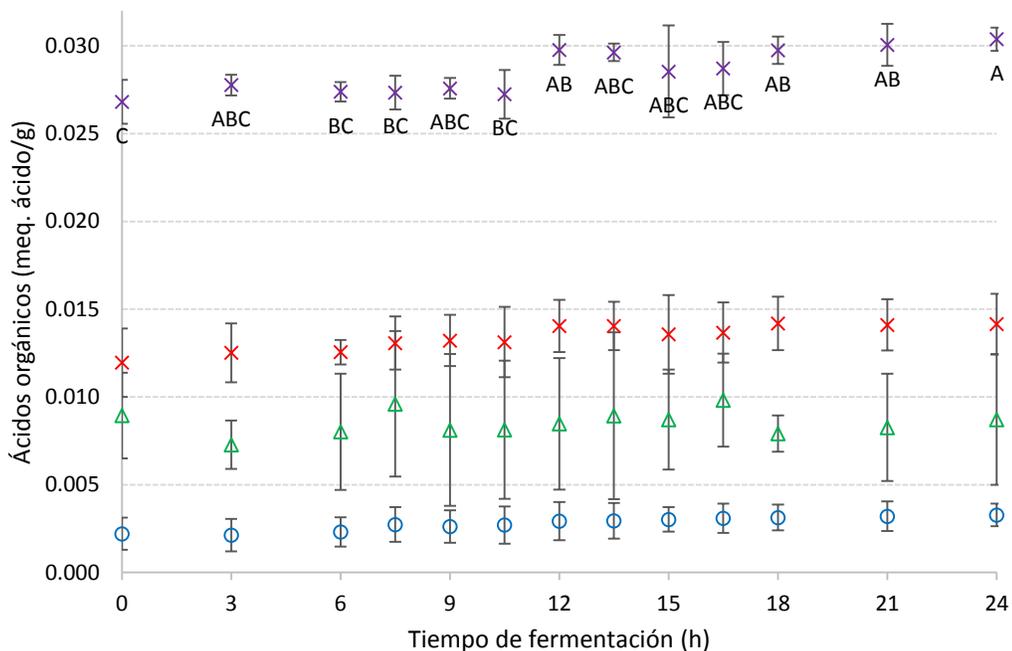
Se debe considerar que el cultivo ha sido diseñado para la obtención de yogurt a partir de leche de vaca, en donde se tiene un pH cercano a la neutralidad (6,7) y lactosa como fuente de carbono (aproximadamente 4,5% p/p). En este caso, el *Streptococcus thermophilus* prefiere la lactosa en lugar de la glucosa como fuente primaria de carbono, pero co-metaboliza sacarosa y lactosa usando un mecanismo de fosfotransferasa (Iyer *et al.*, 2010). El *Lactobacillus*, se emplea glucosa como fuente de carbono, pero debe considerarse que estas bacterias funcionan en simbiosis tal como se detalló en el apartado 1.1.1.

Las condiciones del sustrato cambian significativamente en la fermentación de la mezcla amarilla: el pH es ácido (4,6) y los principales carbohidratos con sacarosa (6,2% p/p), glucosa (0.7% p/p) y fructosa (2.3% p/p).

Estos cambios en las condiciones del medio afectan el metabolismo de las bacterias lácticas inoculadas y han sido estudiados por varios autores. Por ejemplo, para *Lactobacillus*, Serrazanetti (Serrazanetti *et al.*, 2009) recopila algunos de efectos observados en el metabolismo de *Lactobacillus* producidos por diferentes condiciones. Se resalta el efecto de la presión osmótica y de la acidez. El primero, se puede dar cuando el sustrato tiene alta concentración de sales o azúcares, lo que ocasiona una pérdida del agua en el interior de la célula y puede influir en el transporte de nutrientes a través de la membrana celular. En el segundo caso, la célula emplea diferentes mecanismos para mantener el pH intracelular: (1) bombeo de protones desencadenado por enzimas, (2) liberación de amonio de las proteínas, (3) formación de aminas, (4) conversión de glutamina en glutamato en donde se consumen los iones hidronio (5) fermentación maloláctica y (6) desviación del metabolismo del piruvato hacia los compuestos C-4.

Considerando que estos efectos sobre el metabolismo bacteriano han sido estudiados en alimentos diferentes, como el “*Sourdough*”, el comportamiento puede variar al presentado en las mezclas (Serrazanetti *et al.*, 2009).

De forma complementaria se realizó un seguimiento a algunos de los ácidos orgánicos identificados en la mezcla amarilla (succínico, cítrico, málico y láctico), tal como puede verse en la Figura 7.8.



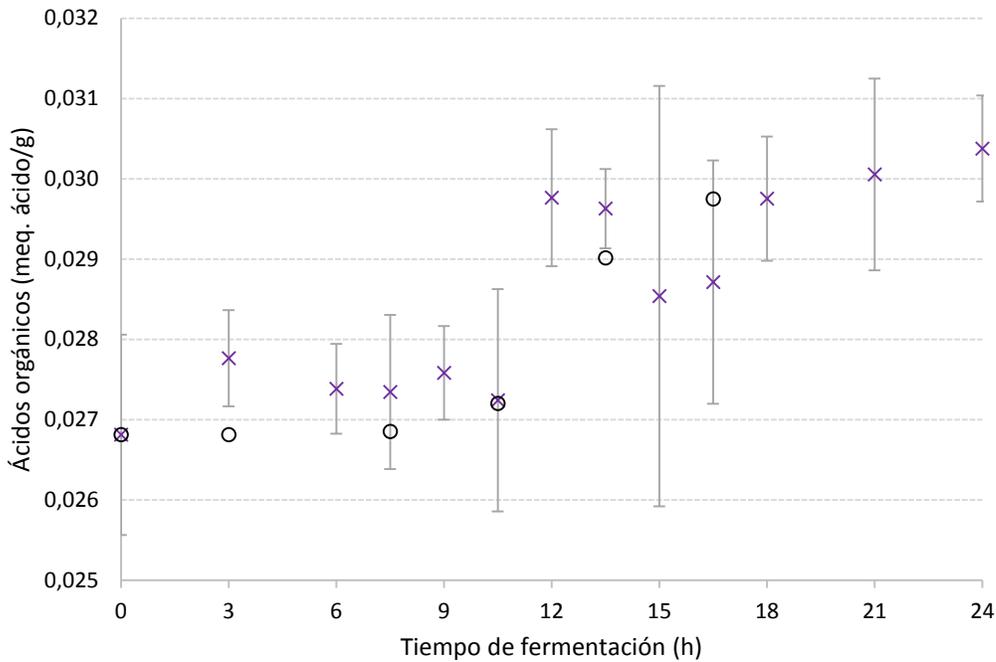
Succínico (o), málico (Δ), cítrico (x), láctico (x).

Figura 7.7: Contenido de ácidos orgánicos durante la fermentación de mezcla amarilla.

Solo se presenta un aumento significativo en el contenido de ácido láctico. Se consideró el modelamiento de la producción de este ácido mediante la ecuación de Luedeking – Piret, considerando que ésta puede estar parcialmente asociada al crecimiento bacteriano y que el modelo ampliamente aplicado en la fermentación láctica. Los resultados pueden verse en la Figura 7.8.

Los resultados se obtuvieron considerando la ecuación logística como cinética del crecimiento bacteriano y minimizando el cuadrado de la diferencia entre el modelo y los datos experimentales. El coeficiente de correlación permite establecer que los datos experimentales no se ajustan al modelo ($R^2 = 0.39$) y los parámetros obtenidos son cercanos al cero ($\alpha = 3.87 \times 10^{-9}$ y $\beta = 1.14 \times 10^{-9}$).

Por lo tanto, se puede deducir que, en esta fermentación específica, la producción de ácido láctico en la mezcla amarilla no se ajusta al modelo considerado y no está asociada al crecimiento de las bacterias lácticas.



Resultados experimentales (x), resultados calculados por el modelo (o).

Figura 7.8: Modelamiento del ácido láctico mediante la ecuación de Luedeking – Piret.

En resumen, el ajuste de los modelos de crecimiento bacteriano está influenciado por las bacterias empleadas y por su comportamiento en el sustrato. Aunque se obtuvieron modelos con buenos ajustes de los datos experimentales, se tienen algunos limitantes. Por ejemplo, la técnica analítica empleada para la determinación de las bacterias viables no permite discriminar entre las cepas empleadas para la fermentación, lo que dificulta identificar una dinámica de crecimiento.

Se presentaron cambios en los parámetros de los modelos al fermentar diferentes sustratos, así como en el coeficiente de correlación con los datos experimentales. Puede decirse que para la fermentación de mezclas rojas y amarillas hay modelos que describen mejor el proceso que otros. Sin embargo, permiten tener una idea sobre lo que ocurre durante la fermentación y pueden mostrar anomalías del proceso.

Al tratarse de un sustrato complejo, el modelamiento se dificulta debido a que son múltiples los factores que intervienen simultáneamente (por ejemplo, las cepas presentes, las fuentes de carbono, los metabolitos producidos). En este caso se

emplearon modelos no estructurados ampliamente aplicados en diversas fermentaciones debido a su simplicidad, lo cual limita el ajuste de los datos experimentales en las fases lag y estacionaria. Sin embargo, los modelos que consideran la variabilidad en estas fases son más complejos y su ajuste requiere mayor información del proceso. Podría tenerse una idea del comportamiento de las bacterias a través de la fermentación de muestras artificiales (o sustratos modelo), de manera que se obtengan modelos que puedan confirmarse posteriormente por medio de la fermentación del alimento real.

8. Evaluación de la vida útil

Con el fin de evaluar el efecto de la fermentación láctica como alternativa de conservación, se determinó el tiempo de vida útil de la mezcla amarilla sin fermentar para luego contrastar los resultados con los de la mezcla fermentada.

El estudio de vida útil se realizó de acuerdo con el procedimiento detallado en el apartado 3.3.5. Se planteó un diseño experimental simple con 9 muestreos por duplicado en los intervalos de tiempo descritos en la Tabla 8-1, para cada una de las temperaturas de almacenamiento. Estas temperaturas se establecieron considerando que aunque los microorganismos patógenos de frutas y verduras son muy variables con respecto a su capacidad de crecer y reproducirse, la mayoría crecerá entre 6 y 35°C (Kilcast and Subramaniam, 2000b; Danalache *et al.*, 2017).

Tabla 8-1. Plan de muestreo para el estudio de vida útil de acuerdo con las temperaturas de almacenamiento.

Muestreo	Tiempo (días)		
	5°C	15°C	25°C
1	0	0	0
2	7	3	0.3
3	10	5	0.9
4	14	7	1.3
5	16	10	1.9
6	24	12	2.1
7	27	14	2.9
8	30	17	3.3
9	34	19	5.9

Se realizó el seguimiento periódico de variables de deterioro fisicoquímico (sólidos solubles totales, pH y acidez titulable), microbiológico (conteo en placa bacterias lácticas y de mohos y levaduras), sensorial (aceptabilidad) y bioactivo (capacidad antirradicalaria) de acuerdo con los métodos de los apartados 3.2.1, 3.2.3 y 3.2.4. Los análisis se realizaron en un tiempo no mayor a 48 horas.

Con los resultados obtenidos para el seguimiento se realizó el modelamiento y la estimación del tiempo de vida útil para la mezcla amarilla fermentada.

8.1 Mezcla amarilla sin fermentar

Se realizó seguimiento del pH, sólidos solubles totales, acidez titulable y crecimiento de mohos y levaduras en el sustrato sin fermentar. Los resultados se muestran en la Tabla 8-2.

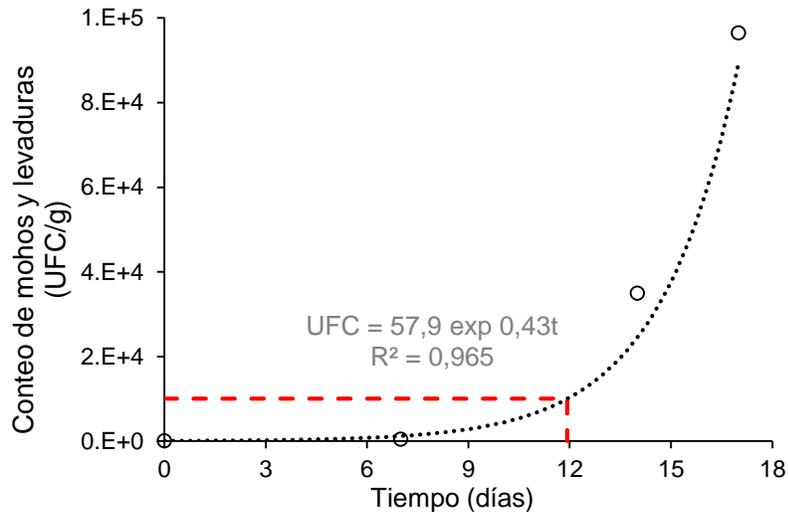
Tabla 8-2. Seguimiento de propiedades fisicoquímicas y microbiológicas de mezcla amarilla sin fermentar.

Tiempo (días)	pH	Sólidos solubles (°Bx)	Acidez titulable (meq. ácido /g pulpa)	Mohos y levaduras (UFC/g)
0	3.97 ± 0.02 ^a	12.5 ± 0.3 ^a	0.069 ± 0.002 ^a	9.3 × 10 ¹ ± 3.2 × 10 ¹
7	4.04 ± 0.03 ^b	11.2 ± 1.5 ^a	0.067 ± 0.001 ^a	4.8 × 10 ² ± 1.5 × 10 ²
14	4.15 ± 0.03 ^b	11.6 ± 0.4 ^a	0.063 ± 0.005 ^a	3.5 × 10 ⁴ ± 1.8 × 10 ⁴
17	4.13 ± 0.02 ^c	11.0 ± 0.6 ^a	0.062 ± 0.06 ^a	9.7 × 10 ⁴ ± 5.2 × 10 ⁴

Los valores medios ± SD (n=4) que no comparten una letra, en la misma columna, son significativamente diferentes con un nivel de confianza del 95%.

Aunque se observan algunas pautas en el comportamiento de las variables fisicoquímicas, en ninguna de ellas se estableció un valor crítico que permitiera establecer un tiempo de vida útil y las diferencias presentadas son significativas solo para el pH. La mezcla sin fermentar no fue rechazada por su apariencia o acidez por parte de los evaluadores, aun cuando a partir de 14 días de almacenamiento presentaba valores anómalos de mohos y levaduras (>3 × 10⁴ UFC/g).

Se estableció como valor crítico de rechazo, por deterioro microbiológico, el conteo de mohos y levaduras superior a 1 × 10⁴ UFC/g de producto (Santos *et al.*, 2005; Putnik *et al.*, 2017). Se observa un crecimiento exponencial del número de colonias en función del tiempo de almacenamiento que supera el valor crítico establecido (línea roja punteada) en la pulpa sin fermentar, presentado en la Figura 8.1. Se estima una vida útil de la pulpa sin fermentar almacenada en refrigeración (5°C) de 11.9 días, valor dentro del rango para productos hortofrutícolas procesados sin conservaciones ni aditivos adicionados (Kong and Singh, 2011).



Conteo de mohos y levaduras (o). Valor crítico: 1×10^4 UFC/g (---).

Figura 8.1: Seguimiento del crecimiento de mohos y levaduras como factor de deterioro microbiológico en la mezcla amarilla sin fermentar.

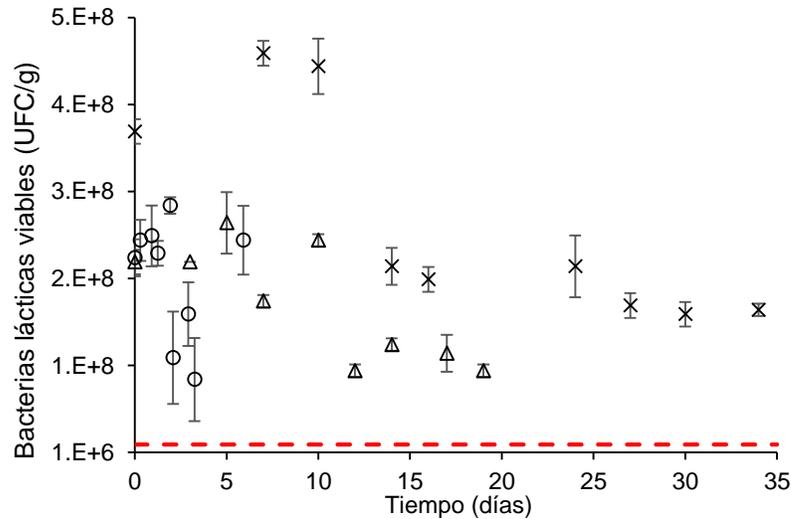
8.2 Mezcla amarilla fermentada

8.2.1 Resultados del seguimiento de variables

- *Bacterias lácticas viables*

Los resultados del seguimiento de las bacterias lácticas a lo largo del almacenamiento a diferentes temperaturas se presentan en la Figura 8.2. Se observa que en todos los casos la cantidad de bacterias lácticas nunca es inferior al valor crítico establecido de 10^7 UFC/g de pulpa fermentada.

Esta concentración de las bacterias inoculadas es relevante debido a que le proporcionan características de alimento funcional por tratarse de microorganismos probióticos. Adicionalmente, el crecimiento de bacterias lácticas genera procesos antagonistas que incluyen la competencia por nutrientes esenciales, disminución del pH y la formación de bacteriocinas, que pueden afectar la supervivencia o el crecimiento de microorganismos deteriorantes (in't Veld, 1996; Beristain-Bauza *et al.*, 2012).

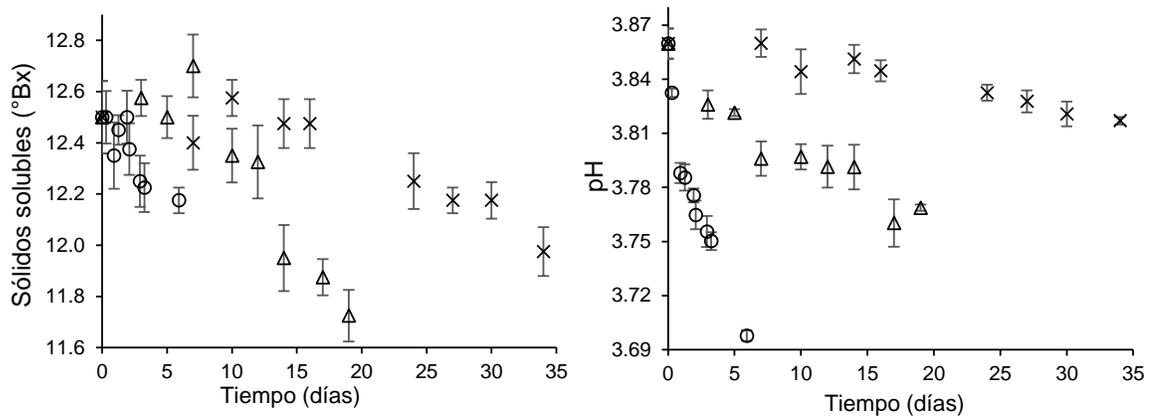


Temperatura de almacenamiento: 5°C (x), 15°C (Δ) y 25°C (o). Valor crítico: 1×10^7 UFC/g (---).

Figura 8.2: Seguimiento de bacterias lácticas viables durante el almacenamiento de la mezcla amarilla fermentada a diferentes temperaturas.

- *Propiedades fisicoquímicas*

En la Figura 8.3 se presentan los resultados del seguimiento de los sólidos solubles (A) y de pH (B) de la mezcla amarilla fermentada durante el almacenamiento a diferentes temperaturas.



Temperatura de almacenamiento: 5°C (x), 15°C (Δ) y 25°C (o).

(A)

(B)

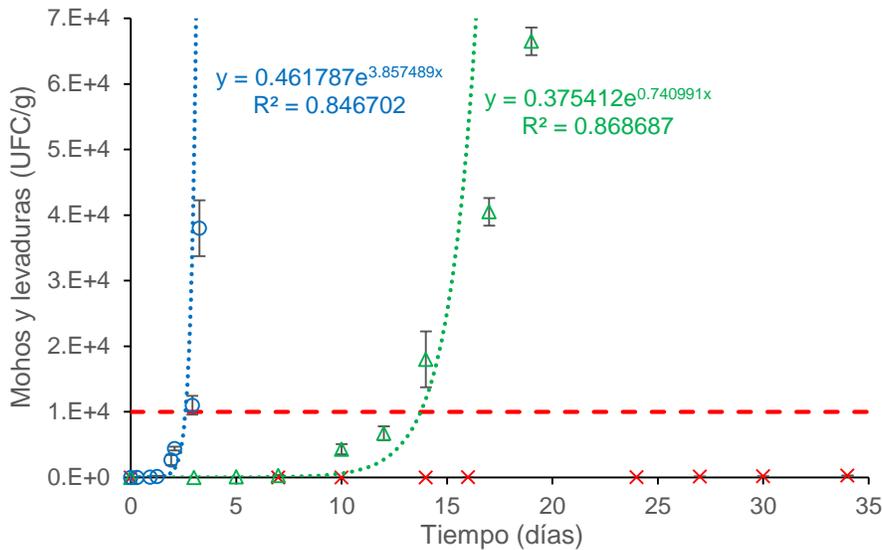
Figura 8.3: Seguimiento de (A) sólidos solubles (B) pH como factores de deterioro fisicoquímico durante el almacenamiento de la mezcla amarilla fermentada a diferentes temperaturas.

Se observa una disminución, tanto del pH como de los sólidos solubles, durante el almacenamiento en las diferentes temperaturas. Considerando que no se observan patrones de aumento en las bacterias lácticas viables, el descenso en estas propiedades no está asociado con el crecimiento de las mismas, pero si pueden presentarse procesos post-fermentativos que se ven favorecidos a medida que la temperatura de almacenamiento se acerca a la temperatura óptima de estos microorganismos.

Este fenómeno favorece el crecimiento simultáneo de mohos y levaduras. Las bacterias normalmente crecen más rápido entre rangos de pH óptimos de 6.0 – 8.0, levaduras entre 4.5 - 6.0 y mohos entre 3.5 - 4.0 (Valero *et al.*, 2012). De esta manera al disminuir el pH en matrices vegetales, el crecimiento de hongos y levaduras se convierten en los procesos específicos de deterioro microbiológico.

- *Propiedades microbiológicas - Mohos y levaduras*

Se realizó el seguimiento al crecimiento de mohos y levaduras en la mezcla amarilla fermentada y almacenada a diferentes temperaturas. Los resultados se presentan en la Figura 8.4.



Temperatura de almacenamiento: 5°C (x), 15°C (Δ) y 25°C (o).

Figura 8.4: Seguimiento de mohos y levaduras como factor de deterioro microbiológico en la mezcla amarilla fermentada y almacenada a diferentes temperaturas.

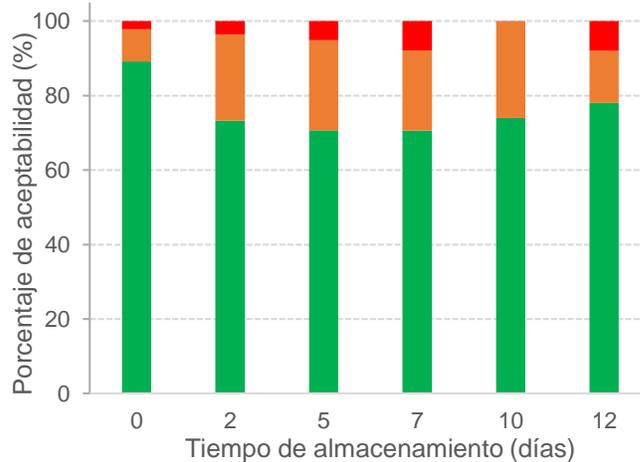
El crecimiento microbiano es el factor crítico que determina el tiempo de vida útil, principalmente en frutas y hortalizas procesadas y es esencial para garantizar la salud y el bienestar de los consumidores, que, como se mencionó anteriormente, está como límite máximo en 1×10^4 UFC/g como criterio de calidad (Smigic *et al.*, 2016; Putnik *et al.*, 2017).

De acuerdo con estos resultados, se determinó que la vida útil de la pulpa fermentada fue de 12.9 días y 2.6 días a 15°C y 25°C respectivamente. Bajo condiciones de almacenamiento a 5°C, después de 34 días el producto no alcanzó a superar el valor crítico para dictaminar su tiempo de vida útil por deterioro microbiológico. Los resultados obtenidos están en concordancia con la característica mesófila de mohos y levaduras, cuya temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre los 15 y 30°C (Madigan *et al.*, 2010).

Los mohos y levaduras pueden afectar una amplia gama de productos que tienen pH bajos. El deterioro por mohos y levaduras a menudo se manifiesta por su crecimiento en la superficie de los productos, como fue evidente en los últimos muestreos realizados, así como por la fermentación de azúcares en productos líquidos y semilíquidos. Aunque no se determinaron las especies específicas de deterioro, se reporta que los productos con altos contenidos de carbohidratos o con bajo pH a menudo sufren contaminación de especies de *Zygosaccharomyces*, *Torulaspota*, *Brettanomyces*, *Saccharomyces*, *Debaryomyces*, *Yarrowia* y *Rhodotorula* (Nychas & Panagou, 2011).

- *Propiedades sensoriales - Aceptabilidad*

Adicionalmente se realizaron análisis sensoriales de la mezcla amarilla fermentada y almacenada a temperatura ambiente (aproximadamente a 17°C en promedio). Los resultados se presentan en la Figura 8.5.



Percepción del consumidor: Me gusta (■); Ni me gusta ni me disgusta (■); Me disgusta (■). (n=90)

Figura 8.5: Análisis hedónico de la mezcla amarilla fermentada y almacenada a temperatura ambiente.

Se presenta una disminución del porcentaje de aceptabilidad de la mezcla amarilla. Llama la atención que después de los 7 días de almacenamiento el porcentaje de aceptabilidad aumenta, a pesar de que microbiológicamente el tiempo de vida útil en las condiciones de almacenamiento es de 9 días. Por lo tanto, en el caso de estudio de la pulpa fermentada, el crecimiento microbiano alcanzó niveles inaceptables mientras el alimento fermentado todavía se considera organolépticamente aceptable por parte de los consumidores.

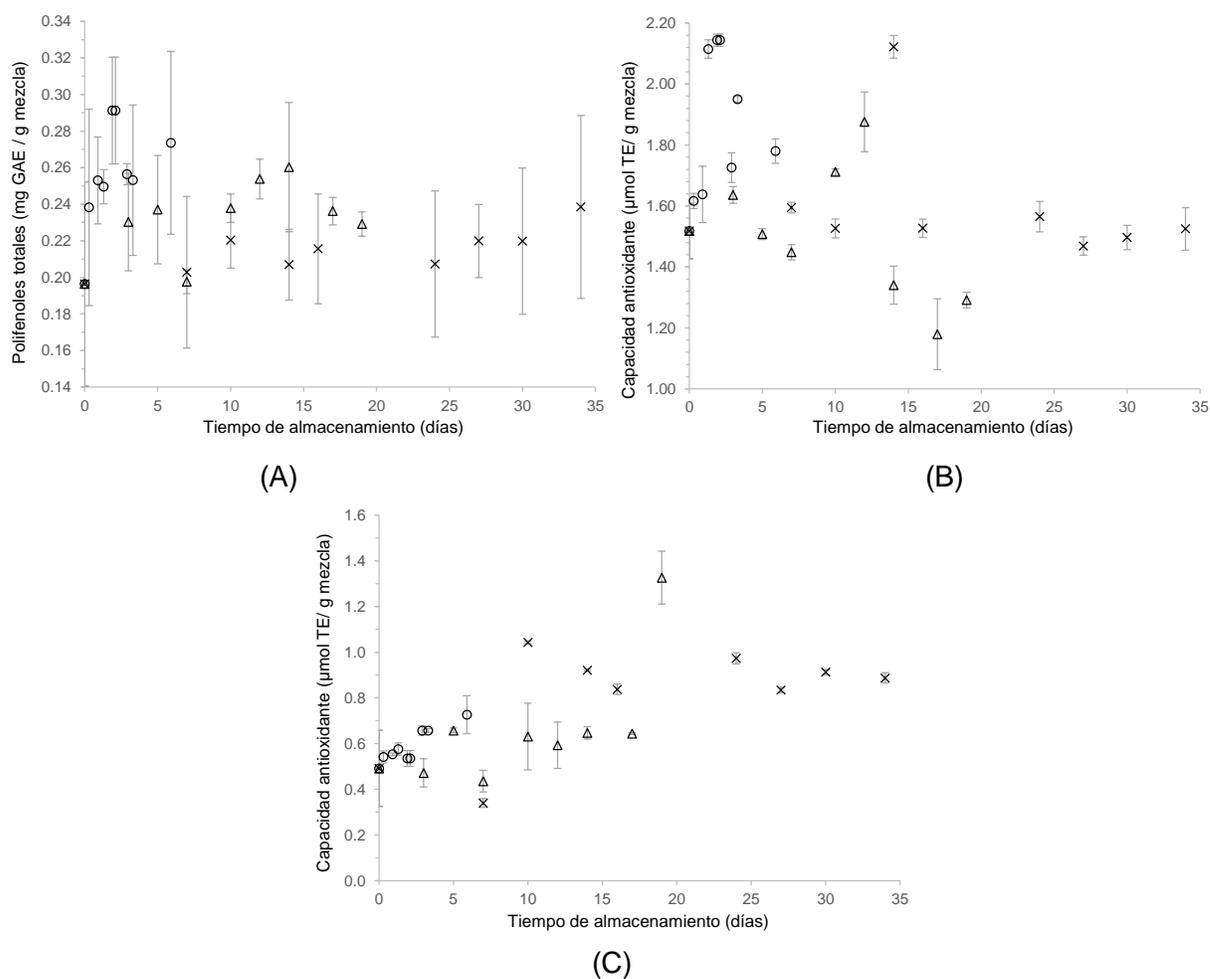
Considerando que los resultados obtenidos para el análisis hedónico fueron determinados en el tiempo y esta es una variable discreta, se aplicó la prueba de Chi² partiendo de la hipótesis nula de que las variables son independientes; es decir, no existe ninguna asociación entre la elección del consumidor y el tiempo de almacenamiento de la muestra.

Se encontró un coeficiente de Pearson 17.778 (con un valor $p = 0.059$) y un valor para la relación de verosimilitud de 20.218 (un valor $p = 0.027$). Esto indica que aunque la hipótesis nula es verdadera, se encuentra en el límite de aceptación y se puede suponer un cierto grado de relación entre las variables ($p \leq 0.05$). Estos resultados pueden estar ligeramente distorsionados debido a que algunos resultados tienen un valor muy pequeño (como los obtenidos para las personas a las que les disgusta la mezcla), por

lo que se deduce que el paso del tiempo no influye en la apreciación más negativa. Aunque podrían combinarse los resultados con la siguiente categoría (Ni me gusta, ni me disgusta), se tomó la decisión de no hacerlo porque se pierde información desde el punto de vista sensorial.

- *Propiedades bioactivas – Capacidad antirradicalaria*

Un comportamiento similar se observa con las características bioactivas. Se evaluó la actividad antirradicalaria de la mezcla amarilla fermentada y almacenada a diferentes temperaturas. Los resultados se presentan en la Figura 8.6.



Temperatura de almacenamiento: 5°C (x), 15°C (Δ) y 25°C (o).

Figura 8.6: Capacidad antioxidante de las pulpas amarillas durante el almacenamiento en diferentes temperaturas. (A) Polifenoles totales, (B) ABTS y (C), FRAP.

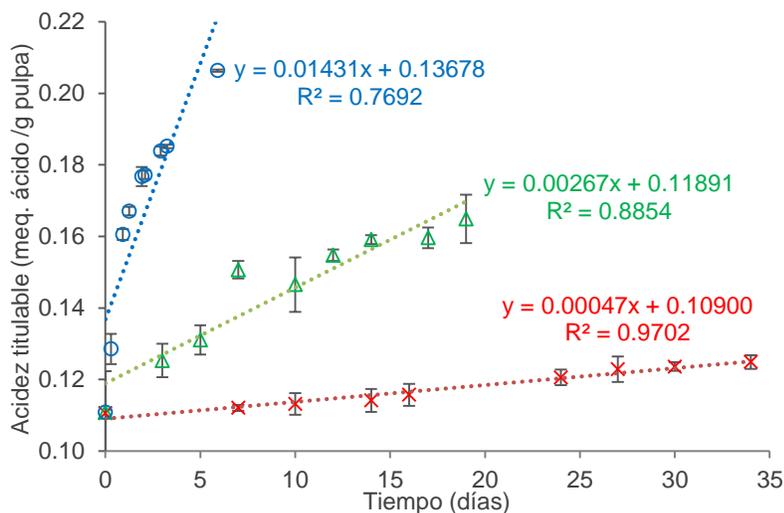
A pesar de observar variaciones en la cuantificación de la capacidad antioxidante, los cambios presentados no son significativos, para ninguna de las temperaturas de almacenamiento evaluadas a lo largo del periodo evaluado. Esto indica que los cambios percibidos en los compuestos bioactivos no pueden considerarse como indicadores de la calidad del producto. En resumen, las propiedades bioactivas (antirradicalarias) permanecen estables a pesar de observarse el crecimiento de mohos y levaduras.

8.2.2 Modelamiento

▪ Deterioro fisicoquímico – acidez titulable

A nivel fisicoquímico se evaluó la acidez titulable como un posible factor de deterioro cuyo valor crítico de rechazo estaría dado a nivel sensorial. Para este tipo de productos no existen lineamientos ni normativa que establezcan un nivel máximo de acidez, dado que la percepción de acidez es muy variable a nivel cultural.

Este factor se ajustó por medio de modelos cinéticos de orden cero, uno o dos en función del tiempo para cada una de las temperaturas de almacenamiento establecidas; el mejor ajuste se obtuvo para la cinética directamente proporcional, de orden cero, que se muestra en la Figura 8.7.



Temperatura de almacenamiento: 5°C (x), 15°C (Δ) y 25°C (o).

Figura 8.7: Ajuste de la acidez titulable como factor de deterioro fisicoquímico en la mezcla amarilla fermentada y almacenada en diferentes temperaturas.

Se obtienen las constantes cinéticas del proceso de deterioro por acidificación a partir de la regresión realizada en la obtención de cada una de las líneas de tendencia (pendientes de las rectas). Sin embargo, con el modelo obtenido, no se pudo estimar el tiempo de vida útil del producto dado que no existe el establecimiento un límite máximo permisible para la acidez en este tipo de productos o análogos.

Al emplear la expresión de Arrhenius linealizada (ecuación 1.20) con las constantes cinéticas características del proceso de deterioro por acidificación obtenidas, se observa un excelente ajuste de la dependencia cinética de este proceso en función de la temperatura de almacenamiento, que se presenta en la Tabla 8-3 y se ilustra en la

Figura 8.8.

Tabla 8-3. Aplicación del modelo de Arrhenius en la cinética de deterioro a partir de la acidez titulable.

T (K)	k (meq. ácido/ g pulpa día)	1/T (K ⁻¹)	Ln (k)
278.15	0.00047	0.0036	-7.6628
288.15	0.00267	0.0035	-5.9257
298.15	0.01431	0.0034	-4.2468

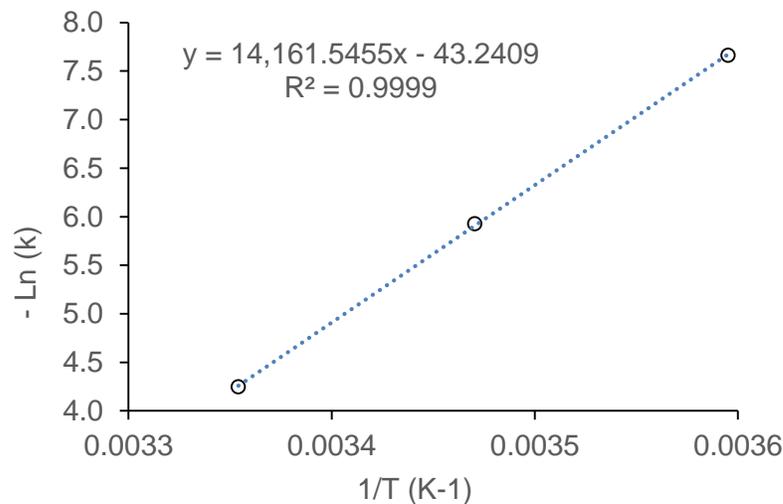


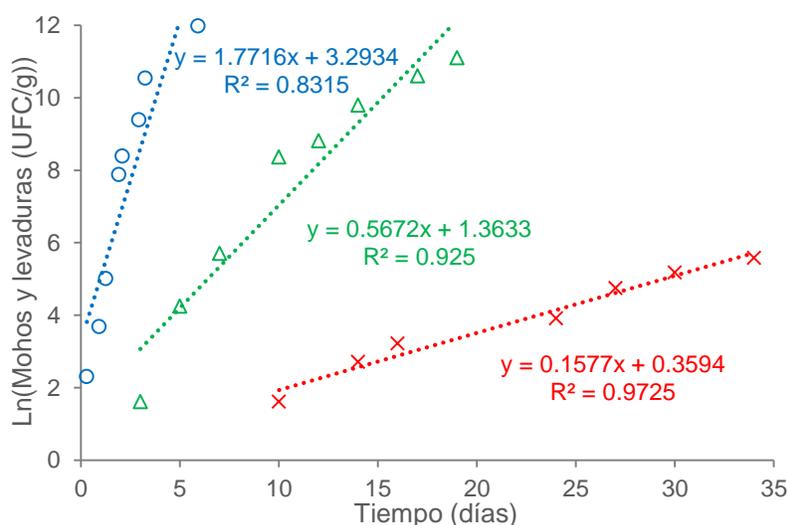
Figura 8.8: Ajuste lineal del modelo de Arrhenius en la cinética de deterioro fisicoquímico en la mezcla amarilla fermentada y almacenada a diferentes temperaturas.

El modelo obtenido nos permite una herramienta práctica para determinar el grado de acidez del producto en función de la acidez inicial y la temperatura de almacenamiento, siempre y cuando se encuentre esta última en el rango modelado. Se obtiene para la

cinética de deterioro fisicoquímico por acidez titulable de la pulpa una energía de activación equivalente de 117.74 kJ/mol.

▪ *Deterioro microbiológico - Mohos y levaduras*

El crecimiento de mohos y levaduras fue evaluado con cinéticas de deterioro, donde el mejor ajuste se logró para reacciones de orden uno (Figura 8.9). Cabe aclarar que en la determinación del orden aparente de reacción se evitaron los puntos iniciales donde los conteos de colonias eran nulos, lo que en la mayoría de casos genera resultados erróneos (Mizrahi, 2011).



Temperatura de almacenamiento: 5°C (x), 15°C (△) y 25°C (o).

Figura 8.9: Ajuste de mohos y levaduras como factor de deterioro microbiológico en la mezcla amarilla fermentada y almacenada a diferentes temperaturas.

Con los resultados obtenidos, se aplicó el modelo de Arrhenius (ecuación 1.20) para establecer la dependencia de la velocidad de deterioro microbiológico en función de la temperatura de almacenamiento. Los resultados se muestran en la Tabla 8-4 y en la Figura 8.10.

Tabla 8-4. Aplicación del modelo de Arrhenius en la cinética de deterioro microbiano.

T (K)	k (UFC/ g pulpa día)	1/T (K ⁻¹)	Ln (k)
278.15	0.1577	0.0036	-1.8471
288.15	0.5672	0.0035	-0.5670
298.15	1.7716	0.0034	0.5719

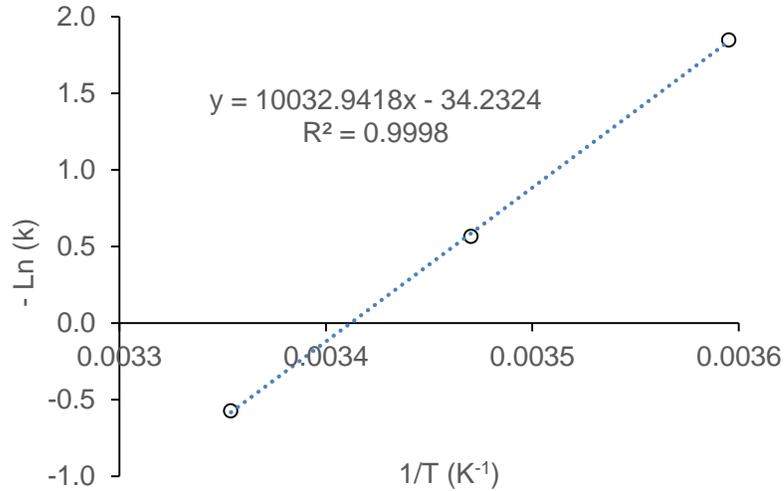


Figura 8.10: Ajuste del modelo de Arrhenius en la cinética de deterioro microbiológico en la mezcla amarilla fermentada y almacenada a diferentes temperaturas.

Para el caso del deterioro microbiológico, se obtuvo una energía de activación de 83.42 kJ/mol. Este valor es inferior a la energía de activación obtenida para la acidez como parámetro de deterioro fisicoquímico (117.74 kJ/mol), lo que indica que su dependencia de la temperatura de almacenamiento es mayor; es decir, la acidificación del producto es más dependiente de la temperatura de almacenamiento comparada con el deterioro microbiológico por mohos y levaduras.

- *Estimación del tiempo de vida útil*

Con los valores obtenidos se pueden realizar estimaciones del tiempo de vida útil dentro del rango de temperaturas evaluado; es decir, cuando el producto se encuentra almacenado entre 5 y 25°C. Para ello, se realizó el cálculo del parámetro Q_{10} , empleando la ecuación 1.22.

$$Q_{10} = \frac{k|_{15^{\circ}\text{C}}}{k|_{5^{\circ}\text{C}}} = \frac{0.5672}{0.1577} = 3.60$$

A partir de este parámetro es posible calcular el tiempo de vida útil (θ) de la mezcla amarilla fermentada y almacenada a 5°C:

$$t_{5^{\circ}\text{C}} = Q_{10} \times t_{15^{\circ}\text{C}} = 3.60 \times 12.9 \text{ días} = 46.4 \text{ días}$$

Con los resultados obtenidos, es posible representar el tiempo de vida útil en escala logarítmica en función de la temperatura en graficas de vida útil para una lectura y estimación directa (Figura 8.11). Se observa una tendencia lineal (ya que se representa el $\ln(t)$) por lo que la estimación del tiempo de vida útil de la pulpa en función de la temperatura de almacenamiento estará dada por la expresión:

$$\ln(t) = -0.1443(T) + 4.6120$$

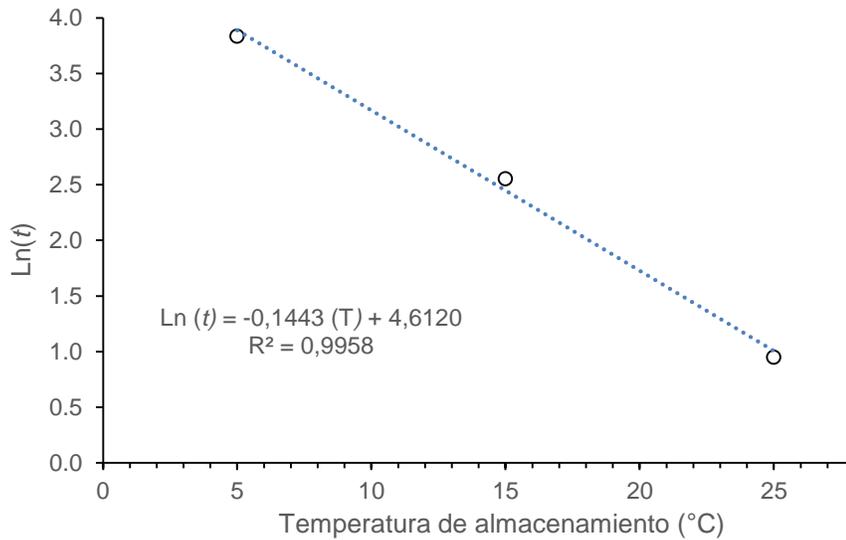


Figura 8.11: Gráfica de tiempo de vida útil de la mezcla amarilla fermentada.

De acuerdo con las estimaciones del tiempo de vida útil se confirma el efecto de la conservación del proceso fermentativo. Las pérdidas de mango antes de llegar al consumidor final, y en general de cualquier producto hortofrutícola, se deben principalmente a su limitada vida útil y mal manejo del producto post cosecha. En Colombia este aspecto es de gran importancia, ya que anualmente las pérdidas de esta fruta son grandes (Naeem *et al.*, 2018; Urieles, 2018, 2019; Eshetu *et al.*, 2019).

Como conclusiones del capítulo se tiene que:

- En la mezcla amarilla el deterioro que primero se produce es el microbiológico. Por lo tanto, la propiedad que funciona como indicador de calidad es la concentración de mohos y levaduras. En consecuencia se resalta que a lo largo del tiempo de vida útil de la mezcla fermentada se mantiene la concentración de bacterias lácticas iniciales.
- Con el fin de simplificar la obtención del modelo se asumió una cinética de crecimiento microbiológico para los mohos y levaduras de orden uno. Sin embargo, como se discutió en el capítulo anterior, podría seguir una cinética más compleja lo cual puede ser una limitante del modelo obtenido.
- Se comprobó el efecto de la fermentación como proceso de conservación de la pulpa amarilla, al obtener mayores tiempos de vida útil.
- El modelo obtenido podría complementarse con el establecimiento del deterioro sensorial y del punto de rechazo por parte de los consumidores.

9. Conclusiones y recomendaciones

9.1 Conclusiones

Se han seleccionado diferentes frutas y hortalizas, a través de una extensa búsqueda bibliográfica, con los siguientes criterios: (1) altas pérdidas, en especial por sobreproducción (2) producción, comercialización y mercado en ascenso y (3) consumo frecuente tanto a nivel nacional (Colombia) como internacional. Ello ha permitido seleccionar ocho frutas y cinco hortalizas, de acuerdo con su color: (1) rojas (mora, fresa, guayaba, remolacha); (2) amarillas (mango, uchuva, maracuyá, ahuyama y zanahoria) y (3) verdes (feijoa, lulo, espinaca y guatila).

Se han obtenido mezclas a partir de estas frutas y hortalizas. Se han determinado sus propiedades fisicoquímicas y con un método estadístico de ordenamiento (conveniencia en función de la utilidad) de los resultados, se han escogido las pulpas con alto potencial para la fermentación. Es decir, mezclas con un valor alto de pH, sólidos solubles y totales así como bajo valor de acidez titulable. Se ha seleccionado una mezcla roja (guayaba 40% p/p y remolacha 60% p/p), una amarilla (mango 80% p/p y ahuyama 20% p/p) y una verde (feijoa 40% p/p y espinaca 60% p/p).

Se han evaluado la neutralización y el acondicionamiento del cultivo como operaciones preliminares a la fermentación. Se ha encontrado que ninguno de estos procesos influye significativamente sobre la fermentación. Por lo tanto, el procedimiento aplicado para la fermentación láctica de las mezclas no incluye estas etapas.

De todas las pulpas de frutas estudiadas, sólo la de mango, permite el crecimiento de las bacterias inoculadas. Por tanto, se descartaron las pulpas de guayaba y feijoa. En la pulpa de mango se han observado variaciones significativas en las propiedades fisicoquímicas: descenso del pH y en los sólidos solubles y aumento en la acidez

titulable. Las pulpas de hortalizas han presentado un crecimiento bacteriano acompañado de los cambios esperados en las variables fisicoquímicas.

Las diferentes mezclas se han fermentado por inoculación directa de los cultivos. La mezcla roja y la amarilla han presentado un crecimiento en los cultivos mixtos, mientras que en los cultivos simples sólo hay un mantenimiento en las bacterias inoculadas con la cepa de *Lactobacillus acidophilus*. La mezcla verde sólo ha presentado mantenimiento de las bacterias inoculadas con la misma cepa. Por ello, se concluye que la pulpa de feijoa de la mezcla inhibe el mantenimiento de las otras bacterias lácticas

La fermentación láctica (en las condiciones establecidas en el presente trabajo, inoculación directa de los cultivos en una dosis aproximada de 10^3 UFC/ g de sustrato, incubación a 42°C durante 24 horas) permite obtener un alimento fermentado, a base de frutas y hortalizas, con una cantidad de bacterias lácticas probióticas viables alta. En el caso de la mezcla amarilla la concentración de microorganismos es mayor de 10^8 UFC/g lo que le proporciona características funcionales a ese alimento.

De acuerdo con los resultados del análisis sensorial, la fermentación láctica no cambia la aceptabilidad de las mezclas entre los consumidores, siendo la mezcla amarilla la de mayor preferencia, seguida de la verde y finalmente la roja. El panel entrenado ha determinado que la principal diferencia es el sabor ácido desarrollado por la fermentación. El panel de expertos ha reconocido cambios más específicos en algunos de los descriptores evaluados, lo cual indica que el proceso fermentativo si cambia el perfil sensorial de las mezclas pero en niveles muy pequeños, difíciles de percibir por el público general

Los resultados del seguimiento al crecimiento bacteriano de las mezclas roja y amarilla han permitido modelar la cinética y se ha comparado con los resultados obtenidos para las pulpas de remolacha y ahuyama. Destaca que para la fermentación de las mezclas el modelo que mejor ajusta es el de la ecuación logística (R^2 entre 0.95 y 0.97), mientras que para las pulpas de hortalizas se obtiene una mejor correlación con el modelo de Gompertz ($R^2 = 0.99$).

El seguimiento de la actividad antirradicalaria realizado durante el proceso fermentativo de las pulpas (remolacha y ahuyama) y mezclas (roja y amarilla), permite afirmar que las propiedades antioxidantes no se afectan significativamente por la fermentación láctica.

Se ha realizado el estudio de vida útil de la mezcla amarilla fermentada. El seguimiento de las propiedades fisicoquímicas, microbiológicas, funcionales y sensoriales ha permitido identificar que el crecimiento de microorganismos contaminantes (mohos y levaduras) es la propiedad que primero cambia, por lo que se ha tomado como el indicador de calidad para este alimento.

El estudio realizado a diferentes temperaturas de almacenamiento ha proporcionado los datos suficientes para la obtención de un modelo que permite predecir el tiempo de vida útil para la mezcla amarilla. Los resultados verifican que el proceso fermentativo ayuda a la conservación de la mezcla, que pasa de 12 días a 46 días.

El presente trabajo de investigación abre un panorama para la transferencia de conocimientos, a diferentes niveles. Las investigaciones en el área microbiológica y del campo de la ingeniería realizadas *a posteriori* podrán partir de los resultados ya obtenidos y, por tanto, avanzar desde lo establecido.

Como conclusión general se puede afirmar que ha quedado demostrada la hipótesis inicial y que se ha diseñado un proceso de transformación para productos hortofrutícolas de origen colombiano que facilita la fermentación láctica en matrices vegetales y ha permitido diseñar la obtención de alimentos con características funcionales, de aceptación y mayor tiempo de vida útil.

9.2 Recomendaciones

- Ampliar el campo de acción a otras frutas y vegetales que presentan exceso de producción, no sólo a nivel de Colombia, sino ampliando a otros países, como los de la cuenca mediterránea.
- Fortalecer el diseño de una metodología que permita identificar y predecir qué sustratos fermentan y cuáles no, tratando de evitar los ensayos experimentales.
- Analizar en profundidad la posible mejora que experimentaría el proceso fermentativo, la vida útil del producto y la viabilidad de las bacterias, con otros cultivos o cepas nativas, así como con la concentración inicial inoculada.
- Realizar estudios de vida útil empleando otros envases más compatibles con el medio ambiente que puedan favorecer la conservación de los productos fermentados.
- Fortalecer el modelamiento del proceso y profundizar el conocimiento relacionado con las rutas metabólicas que siguen los diferentes microorganismos, tanto en los cultivos simples como en los mixtos.
- Encontrar correlaciones entre la evaluación del color realizada en las diferentes pulpas y la actividad antirradicalaria.

Bibliografía

- Abdel-Rahman, M.A., Tashiro, Y. & Sonomoto, K. (2011). Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: Overview and limits. *Journal of Biotechnology*, **156**, 286–301.
- Acosta-Estrada, B.A., Gutiérrez-Urbe, J.A. & Serna-Saldívar, S.O. (2014). Bound phenolics in foods, a review. *Food Chemistry*, **152**.
- Aghababaie, M., Khanahmadi, M. & Beheshti, M. (2015a). Developing a detailed kinetic model for the production of yogurt starter bacteria in single strain cultures. *Food and Bioproducts Processing*, **94**, 657–667.
- Aghababaie, M., Khanahmadi, M. & Beheshti, M. (2015b). Developing a kinetic model for co-culture of yogurt starter bacteria growth in pH controlled batch fermentation. *Journal of Food Engineering*, **166**, 72–79.
- Agroes.es. (2019). Zanahoria, taxonomía, y descripciones botánicas, morfológicas, fisiológicas y ciclo biológico [Internet document] URL <http://www.agroes.es/cultivos-agricultura/cultivos-huerta-horticultura/zanahoria/434-zanahoria-descripcion-morfologia-y-ciclo>. Accessed 25/02/2019.
- AGRONET. Minagricultura. (2018). Estadísticas agrícolas [Internet document] URL <http://www.agronet.gov.co/estadistica/Paginas/default.aspx>. Accessed 23/02/2018.
- Ajila, C.M., Brar, S.K., Verma, M., Tyagi, R.D. & Valéro, J.R. (2011). Solid-state fermentation of apple pomace using *Phanerocheate chrysosporium* - Liberation and extraction of phenolic antioxidants. *Food Chemistry*.
- Alcón Martín, A. (1999). *Desarrollo de modelo cinéticos para bioprocesos: aplicación a la producción de xantano*.
- Almajano, M.P., Carbó, R., Jiménez, J.A.L. & Gordon, M.H. (2008). Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. *Food Chemistry*, **108**, 55–63.
- Amrane, A. & Prigent, Y. (1994). Mathematical model for lactic acid production from lactose in batch culture: Model development and simulation. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, **60**, 241–246.
- Andersson, R. & Hedlund, B. (1983). HPLC analysis of organic acids in lactic acid fermented vegetables. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, **176**, 440–3.
- AOAC. (2005). AOAC 979.23; 954.07; 957.12; 995.06; 984.14.

- Artés, F., Mínguez Mosquera, M.I. & Hornero, D. (2002). Analysing changes in fruit pigments. In: *Colour in food* (edited by D.B. MacDougall). Boca Raton: Woodhead Publishing Limited.
- Askar, A., El-Samahy, S.K. & Abd El-Fadeel, M.G. (1982). Organic acids and free amino acids in some Egyptian fruits and vegetables. *Department of Food Science, University of Zagazig*, **26**, 7–10.
- Asohofrucol. (2006). Plan Frutícola Nacional PFN, 1–40.
- Asohofrucol. (2013). *INFORME FINAL “ PLAN NACIONAL DE FOMENTO HORTIFRUTÍCOLA 2012-2022 , FASE 2013 .”*
- Asohofrucol. (2019a). Frutas [Internet document] URL <http://www.asohofrucol.com.co/frutas.php>. Accessed 25/02/2019.
- Asohofrucol. (2019b). Hortalizas [Internet document] URL http://www.asohofrucol.com.co/hortaliza_detalle.php?id=142. Accessed 25/02/2019.
- Asohofrucol, Garavito, E.J., Jiménez, M., Rueda, M., Rojas, M., Marlen, D., Mendez, V., Moreno, M., García, J.M., Cortes, C., Caro, A., Morad, K., Agricultura, M. De, Pedro, R., Suarez, A., Perez, J., Silva, H., Medina, J.A., Correal, C.C.I.P. & Torres, M.C. (2009). *Guía Ambiental Hortofrutícola de Colombia*.
- Aureli, P., Capurso, L., Castellazzi, A.M., Clerici, M., Giovannini, M., Morelli, L., Poli, A., Pregliasco, F., Salvini, F. & Zuccotti, G.V. (2011). Probiotics and health: An evidence-based review. *Pharmacological Research*, **63**, 366–376.
- Avonts, L., Uytven, E. Van & Vuyst, L. De. (2004). Cell growth and bacteriocin production of probiotic Lactobacillus strains in different media. *International Dairy Journal*, **14**, 947–955.
- Bavec, M., Turinek, M., Grobelnik-Mlakar, S., Slatnar, A. & Bavec, F. (2010). Influence of industrial and alternative farming systems on contents of sugars, organic acids, total phenolic content, and the antioxidant activity of red beet (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris* Rote Kugel). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**, 11825–11831.
- Béal, C., Spinnler, H.E. & Corrieu, G. (1994). Comparison of growth, acidification and productivity of pure and mixed cultures of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* 404 and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 398. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **41**, 95–98.
- Becerra, L. & Leguía, C. (2000). *Validación del proceso para la producción de una bebida de soya y utilización de subproductos*.
- Benítez, R. (2015). Pérdidas y desperdicios de alimentos en América Latina y el Caribe [Internet document] . *Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe* URL <http://www.fao.org/americas/noticias/ver/es/c/239393/>. Accessed.
- Beristain-Bauza, S., Palou, E. & López-Malo, A. (2012). Bacteriocinas : antimicrobianos naturales y su aplicación en los alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, **6**, 64–78.

- Berkman, T., Bozoglu, T.F. & Özilgen, M. (1990). Mixed culture growth kinetics of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. *Enzyme and Microbial Technology*, **12**, 138–140.
- Bhat, R., Suryanarayana, L.C., Chandrashekara, K.A., Krishnan, P., Kush, A. & Ravikumar, P. (2015). *Lactobacillus plantarum* mediated fermentation of *Psidium guajava* L. fruit extract. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **119**, 430–432.
- Bourdichon, F., Casaregola, S., Farrokh, C., Frisvad, J.C., Gerds, M.L., Hammes, W.P., Harnett, J., Huys, G., Laulund, S., Ouwehand, A., Powell, I.B., Prajapati, J.B., Seto, Y., Schure, E. Ter, Boven, A. Van, Vankerckhoven, V., Zgoda, A., Tuijelaars, S. & Hansen, E.B. (2012). Food fermentations: microorganisms with technological beneficial use. *International journal of food microbiology*, **154**, 87–97.
- Brewer, M.S. (2011). Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **10**, 221–247.
- Brown, T.L., LeMay, H.E. & Bursten, B.E. (1993). *Química. La ciencia central*. Quinta Ed. Mexico: Prentice - Hall Hispanoamericana, S.A.
- Bujna, E., Farkas, N.A., Tran, A.M., Dam, M.S. & Nguyen, Q.D. (2018). Lactic acid fermentation of apricot juice by mono- and mixed cultures of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *Food Science and Biotechnology*, **27**, 547–554.
- Burgos-Rubio, C.N., Okos, M.R. & Wankat, P.C. (2000). Kinetic Study of the Conversion of Different Substrates to Lactic Acid Using *Lactobacillus bulgaricus*. *Biotechnology progress*, **16**, 305–314.
- Butel, M.J. (2014). Probiotics, gut microbiota and health. *Medecine et Maladies Infectieuses*.
- Cagno, R. Di, Coda, R., Angelis, M. De & Gobbetti, M. (2013). Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. *Food microbiology*, **33**, 1–10.
- Cagno, R. Di, Minervini, G., Rizzello, C.G., Angelis, M. De & Gobbetti, M. (2011a). Effect of lactic acid fermentation on antioxidant, texture, color and sensory properties of red and green smoothies. *Food microbiology*, **28**, 1062–71.
- Cagno, R. Di, Surico, R.F., Minervini, G., Angelis, M. De, Rizzello, C.G. & Gobbetti, M. (2009). Use of autochthonous starters to ferment red and yellow peppers (*Capsicum annum* L.) to be stored at room temperature. *International journal of food microbiology*, **130**, 108–16.
- Cagno, R. Di, Surico, R.F., Minervini, G., Rizzello, C.G., Lovino, R., Servili, M., Taticchi, A., Urbani, S. & Gobbetti, M. (2011b). Exploitation of sweet cherry (*Prunus avium* L.) puree added of stem infusion through fermentation by selected autochthonous lactic acid bacteria. *Food microbiology*, **28**, 900–9.
- Cagno, R. Di, Surico, R.F., Siragusa, S., Angelis, M. De, Paradiso, A., Minervini, F., Gara, L. De & Gobbetti, M. (2008). Selection and use of autochthonous mixed starter for lactic acid fermentation of carrots, French beans or marrows. *International journal of food microbiology*, **127**, 220–8.

- Calderón Vargas, J.F. (2017). *Ajuste de un modelo cinético para el crecimiento de Lactobacillus acidophilus en la fermentación de un sustrato complejo*. Fundación Universidad de América.
- Cano, M.P., Torija, E., Marín, M.A. & Cámara, M. (1994). A simple ion-exchange chromatographic determination of non-volatile organic acids in some Spanish exotic fruits. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, **199**, 214–218.
- Caplice, E. (1999). Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*, **50**, 131–149.
- Castellanos, D.A., Polanía, W. & Herrera, A.O. (2016). Development of an equilibrium modified atmosphere packaging (EMAP) for feijoa fruits and modeling firmness and color evolution. *Postharvest Biology and Technology*, **120**, 193–203.
- Castillo Martínez, F.A., Balciunas, E.M., Salgado, J.M., Domínguez González, J.M., Converti, A. & Oliveira, R.P. de S. (2013). Lactic acid properties, applications and production: A review. *Trends in Food Science & Technology*, **30**, 70–83.
- CCB, C. de C. de B. (2006). *Balance Tecnológico Cadena Productiva Hortofrutícola en Bogotá y Cundinamarca*. Bogotá D.C.
- CCI, C.C.I. (2007). *Plan Horticola Nacional - PHN*. Asohofrucol.
- Champagne, C.P., Gardner, N., Lafleur, S. & Savard, T. (2010). Population Yields and Vegetable Juice Fermentation of *Leuconostoc mesenteroides* Cultures Grown Under Free-Cell or Immobilized-Cell Technologies. *Food Biotechnology*, **24**, 1–18.
- Charles, W.W., Philip, E.S. & Carl, W.C. (2006). Determination of organic acids and sugars in guajava L. cultivars by high-performance liquid chromatography. *Journal of the Food and Agriculture*, **33**, 777–780.
- Coda, R., Lanera, A., Trani, A., Gobbetti, M. & Cagno, R. Di. (2012). Yogurt-like beverages made of a mixture of cereals, soy and grape must: microbiology, texture, nutritional and sensory properties. *International journal of food microbiology*, **155**, 120–7.
- Cogan, T.M., Beresford, T.P., Steele, J., Broadbent, J., Shah, N.P. & Ustunol, Z. (2007). Invited review: Advances in starter cultures and cultured foods. *Journal of dairy science*, **90**, 4005–21.
- CONPES 113. (2008). Documento Conpes Social 113. Política nacional de seguridad alimentaria y nutricional.
- CONPES 3439. (2006). Documento Conpes 3439. Institucionalidad y principios rectores de política para la competitividad y productividad, **15**, 30–39.
- CONPES 3514. (2008). Documento Conpes 3514. Política nacional fitosanitaria y de inocuidad para las cadenas de frutas y otros vegetales.
- CONPES 3527. (2008). Documento Conpes 3527. Política nacional de competitividad y productividad. *Departamento Nacional de Planeación*, 83.

- CONPES 3668. (2010). Documento Conpes 3668 Informe de Seguimiento a la Política Nacional de Competitividad y Productividad, 1–143.
- Corabastos. (2018). Boletín diario de precios. Histórico. [Internet document] URL https://www.corabastos.com.co/aNuevo/index.php?option=com_content&view=article&id=471&Itemid=290. Accessed 15/12/2017.
- Corradini, M.G. & Peleg, M. (2007). Shelf-life estimation from accelerated storage data. *Trends in Food Science and Technology*, **18**, 37–47.
- Corrales, L.C. & Muñoz Ariza, M.M. (2012). Estrés oxidativo : origen , evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Nova - Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*, **10**, 213–225.
- Corrêa, S.C., Pinheiro, A.C.M., Siqueira, H.E., Carvalho, E.M., Nunes, C.A. & Vilas Boas, E.V.D.B. (2014). Prediction of the sensory acceptance of fruits by physical and physical–chemical parameters using multivariate models. *LWT - Food Science and Technology*, **59**, 666–672.
- Cruz, J.N., Soares, C.A., Fabbri, A.D.T., Cordenunsi, B.R. & Sabato, S.F. (2012). Effect of quarantine treatments on the carbohydrate and organic acid content of mangoes (cv. Tommy Atkins). *Radiation Physics and Chemistry*, **81**, 1059–1063.
- Danalache, F., Carvalho, C.Y., Brito, L., Mata, P., Moldão-Martins, M. & Alves, V.D. (2017). Effect of thermal and high hydrostatic pressure treatments on mango bars shelf-life under refrigeration. *Journal of Food Engineering*, **212**, 113–120.
- DANE. (2016). Encuesta Nacional Manufacturera.
- DANE. (2018). *Importaciones según clasificación CIU Rev. 3 / 2000 - 2017 (Diciembre)*. Bogotá D.C., Colombia.
- Decker, E.A., Warner, K., Richards, M.P. & Shahidi, F. (2005). Measuring antioxidant effectiveness in food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 4303–4310.
- Deloitte & Alimentacion, M. de agricultura pesca y. (2004). Armonización y Homogeneización de Fuentes. Estudio de frutas y hortalizas frescas.
- Derossi, a., Mastrandrea, L., Amodio, M.L., Chiara, M.L.V. de & Colelli, G. (2016). Application of multivariate accelerated test for the shelf life estimation of fresh-cut lettuce. *Journal of Food Engineering*, **169**, 122–130.
- Devlieghere, F., Vermeiren, L. & Debevere, J. (2004). New preservation technologies: Possibilities and limitations. *International Dairy Journal*, **14**, 273–285.
- Dimitrios, B. (2006). Sources of natural phenolic antioxidants. *Trends in Food Science and Technology*, **17**, 505–512.
- DNP. (2014). *Bases y Plan Nacional de Desarrollo 2014 - 2018*.
- DNP, D.N. de P. (2004). *Cadenas productivas- Estructura, comercio internacional y protección*. Bogotá.
- DNP, D.N. de P. (2005). Programa Visión Colombia 2019 [Internet document] URL <https://www.dnp.gov.co/politicas-de-estado/vision-colombia-2019/Paginas/programa->

vision-colombia-2019.aspx. Accessed 26/02/2018.

DNP, D.N. de P. (2016). *Pérdida y desperdicio de alimentos en Colombia. Estudio de la Dirección de seguimiento y evaluación de políticas públicas*. Bogotá D.C., Colombia.

DNP, D.N. de P. (2018). *Estadísticas Sectoriales*. Bogotá D.C., Colombia.

Dominguez, Z. & Mario, C. (2011). Análisis Estadístico Multivariado : una Herramienta Estratégica para el Control de Procesos y Calidad en la Industria Agroalimentaria
Multivariate Statistical Analysis : a Strategic Tool for Quality and Processes Control in Food Industry Resumen Introducc, 143–157.

Doran, P.M.. (1995). *Bioprocess Engineering Principles*. San Diego.

Dutta, R. (2008). *Fundamentals of Biochemical Engineering. Fundamentals of Biochemical Engineering*.

EFE. (2016). Por su ubicación, Colombia podría ser una despensa mundial de alimentos. *Portafolio*.

Encolombia. (2019). Cultivo de Guayaba [Internet document] URL <https://encolombia.com/economia/agroindustria/cultivo/cultivodeguayaba/>. Accessed 25/02/2019.

Eshetu, A., Ibrahim, A.M., Forsido, S.F. & Kuyu, C.G. (2019). Effect of beeswax and chitosan treatments on quality and shelf life of selected mango (*Mangifera indica* L .) cultivars. *Heliyon*, **5**, 1–22.

Espinosa-Pardo, F.A., Martinez, J. & Martinez-Correa, H.A. (2014). Extraction of bioactive compounds from peach palm pulp (*Bactris gasipaes*) using supercritical CO₂. *Journal of Supercritical Fluids*, **93**, 2–6.

Everette, J.D., Bryant, Q.M., Green, A.M., Abbey, Y.A., Wangila, G.W. & Walker, R.B. (2010). Thorough study of reactivity of various compound classes toward the folin-Ciocalteu reagent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**, 8139–8144.

Fao. (2001). Probiotics in food. *Food and Nutrition Paper*, **85**, 71.

FAO. (2011). *Pérdidas y desperdicio de alimentos en el mundo - Alcance, causas y prevención*. Save Food. Roma.

FAO. (2014a). *Iniciativa mundial sobre la reducción de la pérdida y el desperdicio de alimentos*.

FAO. (2014b). *Pérdidas y desperdicios de alimentos en América Latina y el Caribe - Julio 2014*.

FAO. (2018). Colombia en una mirada [Internet document] URL <http://www.fao.org/colombia/fao-en-colombia/colombia-en-una-mirada/es/>. Accessed.

Fao & MinSalud. (2013). *Perfil nacional de consumo de frutas y verduras*. Fao. Bogotá D.C.

- FAO, O. regional para A.L. y el C., Santivañez, T., Granados, S., Herrera, M., Nahmias, F. & Caprilo, S. (2016). *Pérdidas y desperdicios de alimentos en América Latina y el Caribe*.
- FAOSTAT. (2017). Datos sobre alimentación y agricultura [Internet document] URL <http://www.fao.org/faostat/es/#compare>. Accessed 21/02/2018.
- Filannino, P., Azzi, L., Cavoski, I., Vincentini, O., Rizzello, C.G., Gobbetti, M. & Cagno, R. Di. (2013). Exploitation of the health-promoting and sensory properties of organic pomegranate (*Punica granatum* L.) juice through lactic acid fermentation. *International journal of food microbiology*, **163**, 184–92.
- Filannino, P., Bai, Y., Cagno, R. Di, Gobbetti, M., Gänzle, M.G., Gänzle, M.G. & Gänzle, M.G. (2015). Metabolism of phenolic compounds by *Lactobacillus* spp. during fermentation of cherry juice and broccoli puree. *Food Microbiology*, **46**, 272–279.
- Filannino, P., Cardinali, G., Rizzello, C.G., Buchin, S., Angelis, M. De, Gobbetti, M. & Cagno, R. Di. (2014). Metabolic responses of *Lactobacillus plantarum* strains during fermentation and storage of vegetable and fruit juices. *Applied and Environmental Microbiology*, **80**.
- FINAGRO. (2014). *Perspectiva del sector agropecuario Colombiano*, 28.
- Foligné, B., Daniel, C. & Pot, B. (2013). Probiotics from research to market: The possibilities, risks and challenges. *Current Opinion in Microbiology*.
- Forestell, C.A. & Mennella, J.A. (2007). Early Determinants of Fruit and Vegetable Acceptance. *PEDIATRICS*, **120**, 1247–1254.
- Friedman, M. & Jürgens, H.S. (2000). Effect of pH stability of plant phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**, 2101–2110.
- Gabriela, M., Iradi, G., María, D. & Pablos, P.A. (2016). Estudio de la actividad antioxidante de diversas plantas aromáticas y/o comestibles, 76–80.
- Galindo Triana, G.P. (2015). *Hábitos de consumo de frutas y hortalizas en personas de 15 a 39 años, habitantes de Bogotá*.
- Galvis, J.A., Arjona, H., Fischer, G., Landwehr, T. & Martinez, R. (2002). Influencia de la temperatura y el tiempo de almacenamiento en la conservación de frutas. *Agronomía Colombiana*, **19**, 23–35.
- Geeraerd, A., Herremans, C., Cenens, C. & Impe, J. Van. (1998). Application of artificial neural networks as a non-linear modular modeling technique to describe bacterial growth in chilled food products. *International journal of food microbiology*, **44**, 49–68.
- Gent, M.P.N. (2016). Effect of Irradiance and Temperature on Composition of Spinach. *HORTSCIENCE*, **51**, 133–140.
- Ghaffar, T., Irshad, M., Anwar, Z., Aqil, T., Zulifqar, Z., Tariq, A., Kamran, M., Ehsan, N. & Mehmood, S. (2014). Recent trends in lactic acid biotechnology: A brief review on production to purification. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, **7**,

222–229.

- Giménez, A., Ares, F. & Ares, G. (2012). Sensory shelf-life estimation: A review of current methodological approaches. *Food Research International*, **49**, 311–325.
- Goldberg, R.N., Kishore, N. & Lennen, R.M. (2002). Thermodynamic quantities for the ionization reactions of buffers. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, **31**, 231–370.
- Gomes, A.M.P. & Malcata, F.X. (1999). Bifidobacterium spp. and Lactobacillus acidophilus: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food Science & Technology*, **10**, 139–157.
- Granato, D., Branco, G.F., Cruz, A.G., Faria, J. de A.F. & Shah, N.P. (2010). Probiotic dairy products as functional foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **9**, 455–470.
- Gülçin, I. (2012). Antioxidant activity of food constituents: An overview. *Archives of Toxicology*, **86**, 345–391.
- Halliwell, B. (2001). Food - Derived Antioxidants: How to Evaluate Their Importance in Food and In Vivo. In: *Handbook of Antioxidants* (edited by L. Packer). Pp. 1–53. Boca Raton: CRC Press.
- Harman, J.E. (1987). Feijoa fruit: Growth and chemical composition during development. *New Zealand Journal of Experimental Agriculture*, **15**, 209–215.
- Hidalgo, F.J. & Zamora, R. (2017). *Food Processing Antioxidants. Advances in Food and Nutrition Research*. 1st edn. Elsevier Inc.
- Hossain, M.A., Rana, M.M., Kimura, Y. & Roslan, H.A. (2014). Changes in biochemical characteristics and activities of ripening associated enzymes in mango fruit during the storage at different temperatures. *BioMed Research International*, **2014**.
- Hough, G. (2010). *Sensory Shelf Life Estimation of Food Products*.
- Huang, D., Boxin, O.U. & Prior, R.L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 1841–1856.
- Hugenholtz, J. (2013). Traditional biotechnology for new foods and beverages. *Current opinion in biotechnology*, **24**, 155–9.
- Hur, S.J., Lee, S.Y., Kim, Y.-C.C., Choi, I. & Kim, G.-B.B. (2014). Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods. *Food Chemistry*, **160**, 346–356.
- Hutado, M., Sánchez, M. de C. & Torija, E. (2008). *Frutas y Verduras, Fuentes de Salud. Nutrición y Salud*.
- ICA, I.C.A. (2013). Colombia avanza en admisibilidad sanitaria de los productos agropecuarios: ICA [Internet document] . *ICA Comunica* URL <https://www.ica.gov.co/Periodico-Virtual/Prensa/2013/Colombia-avanza-en-admisibilidad-sanitaria-de-los.aspx>. Accessed 23/02/2018.

- ICBF, I.C. de B.F. (2015). *Hoja de Balance de Alimentos Colombiana. Cuatrienio 2009 - 2012*. Bogotá D.C., Colombia.
- ICBF, I.C. de B.F., MinSalud, M. de la P.S., Profamilia & Instituto Nacional de Salud. (2010). *Encuesta Nacional de la Situación Nutricional en Colombia 2010*.
- ICONTEC. (1997). NTC 4132. Microbiología. Guía general para el recuento de mohos y levaduras. Técnica de recuento de colonias a 25 °C.
- Illescas, J.L. (2016). Mercado de frutas y hortalizas, **3**, 92–133.
- in't Veld, J.H.J.H. (1996). Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. *International Journal of Food Microbiology*, **33**, 1–18.
- Infoagro. (2019a). El cultivo de la Fresa [Internet document] URL http://www.infoagro.com/documentos/el_cultivo_fresa.asp. Accessed 25/02/2019.
- Infoagro. (2019b). Mango [Internet document] URL http://www.infoagro.com/frutas/frutas_tropicales/mango.htm. Accessed 25/02/2019.
- Infoagro. (2019c). El cultivo de guayaba [Internet document] URL http://www.infoagro.com/documentos/el_cultivo_guayaba.asp. Accessed 25/02/2019.
- ISO. (2010). ISO 27205. Fermented milk products - bacterial starter cultures.
- ISO 10504:1988. (1988). ISO 10504:1988.
- Iyer, R., Tomar, S.K., Uma Maheswari, T. & Singh, R. (2010). Streptococcus thermophilus strains: Multifunctional lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, **20**, 133–141.
- Jack Francis, F. (2002). Food colorings. In: *Colour in food* (edited by D.B. MacDougall). Boca Raton: Woodhead Publishing Limited.
- Jaiswal, A.K. & Abu-Ghannam, N. (2013). Kinetic studies for the preparation of probiotic cabbage juice: Impact on phytochemicals and bioactivity. *Industrial Crops and Products*, **50**, 212–218.
- Javed, M.S., Randhawa, M.A., Butt, M.S. & Nawaz, H. (2016). Effect of Calcium Lactate and Modified Atmosphere Storage on Biochemical Characteristics of Guava Fruit. *Journal of Food Processing and Preservation*, **40**, 657–666.
- Juturu, V. & Wu, J.C. (2016). Microbial production of lactic acid: the latest development. *Critical Reviews in Biotechnology*, **36**, 967–977.
- Kaprasob, R., Kerdchoechuen, O., Laohakunjit, N., Sarkar, D. & Shetty, K. (2017). Fermentation-based biotransformation of bioactive phenolics and volatile compounds from cashew apple juice by select lactic acid bacteria. *Process Biochemistry*, **59**.
- Kevers, C., Falkowski, M., Tabart, J., Defraigne, J.-O.O., Dommès, J. & Pincemail, J. (2007). Evolution of antioxidant capacity during storage of selected fruits and vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**, 8596–8603.
- Khan, S.A.K.U., Singh, Z., Musa, M.M.A. & Payne, A.D. (2016). 1-Hexylcyclopropene in retarding tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruit ripening and its mode of

- action. *Scientia Horticulturae*, **213**, 410–417.
- Kidmose, U., Edelenbos, M., Norbaek, R. & Christensen, L.P. (2002). Colour stability in vegetables. In: *Colour in food* (edited by D.B. MacDougall). Boca Raton: Woodhead Publishing Limited.
- Kilcast, D. (2000). *Sensory evaluation methods for shelf-life assessment. The stability and shelf-life of food*. Cambridge.
- Kilcast, D. & Subramaniam, P. (2000a). Introduction. In: *The stability and shelf-life of food* (edited by D. Kilcast & P. Subramaniam). Cambridge: Woodhead Publishing Limited.
- Kilcast, D. & Subramaniam, P. (2000b). *The stability and shelf-life of food*. First edit. Cambridge: Woodhead Publishing Limited.
- King, S.C. & Meiselman, H.L. (2010). Development of a method to measure consumer emotions associated with foods. *Food Quality and Preference*, **21**, 168–177.
- Koh, E., Charoenprasert, S. & Mitchell, A.E. (2012). Effect of organic and conventional cropping systems on ascorbic acid, vitamin C, flavonoids, nitrate, and oxalate in 27 varieties of spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **60**, 3144–3150.
- Kong, F. & Singh, R.P. (2011). Chemical deterioration and physical instability of foods and beverages. In: *Food and Beverage Stability and Shelf Life* (edited by D. Kilcast & P. Subramaniam). Pp. 29–62. Elsevier.
- Kopta, T., Híc, P., Šlosár, M. & Pokluda, R. (2018). Quality changes in organic and conventional Hokkaido pumpkin (*Cucurbita maxima* Duch.) during storage. *Biological Agriculture & Horticulture*, **34**, 1–9.
- Kuskoski, E.M., Asuero, A.G., Troncoso, A.M., Mancini-Filho, J. & Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, **25**, 726–732.
- Kwan, T.H., Hu, Y. & Lin, C.S.K. (2016). Valorisation of food waste via fungal hydrolysis and lactic acid fermentation with *Lactobacillus casei* Shirota. *Bioresource Technology*, **217**, 129–136.
- Kwan, T.H., Vlysidis, A., Wu, Z., Hu, Y., Koutinas, A. & Lin, C.S.K. (2017). Lactic acid fermentation modelling of *Streptococcus thermophilus* YI-B1 and *Lactobacillus casei* Shirota using food waste derived media. *Biochemical Engineering Journal*, **127**, 97–109.
- Labuza, T.P. & Schmidl, M.K. (1985). Accelerated shelf-life testing of foods. *Food technology*, **39**, 57–62.
- Lee, S.M., Lee, K.T., Lee, S.H. & Song, J.K. (2013). Origin of human colour preference for food. *Journal of Food Engineering*, **119**, 508–515.
- Lemańska, K., Szymusiak, H., Tyrakowska, B., Zieliński, R., Soffers, A.E.M.F. & Rietjens, I.M.C.M. (2001). The influence of pH on antioxidant properties and the mechanism of antioxidant action of hydroxyflavones. *Free Radical Biology and Medicine*, **31**, 869–

881.

- Leroy, F., Verluyten, J. & Vuyst, L. De. (2006). Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *International journal of food microbiology*, **106**, 270–85.
- Lin, Y.D., Clydesdale, F.M. & Francis, F.J. (1971). Organic Acid Profiles of Thermally Processed, Stored Spinach Puree. *Journal of Food Science*, **36**, 240–242.
- Liu, X.X., Zhou, K., Hu, Y., Jin, R., Lu, L.L., Jin, C.W. & Lin, X.Y. (2015). Oxalate synthesis in leaves is associated with root uptake of nitrate and its assimilation in spinach (*Spinacia oleracea* L.) plants. *JOURNAL OF THE SCIENCE OF FOOD AND AGRICULTURE*, **95**, 2105–2116.
- Llc, C.R.C.P. (2003). *Functional Foods. Processing*.
- Lourens-Hattingh, A. & Viljoen, B.C. (2001). Yogurt as probiotic carrier food. *International Dairy Journal*, **11**, 1–17.
- MacDougall, D.B. (2002). Colour measurement of food. Principles and practice. In: *Colour in food*. Boca Raton: Woodhead Publishing Limited.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Stahl, D.A. & Clark, D.P. (2010). *Brock Biology of microorganisms*. 13a edn. Benjamin Cummings.
- Magalhães, L.M., Segundo, M.A., Reis, S. & Lima, J.L.F.C. (2008). Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*, **613**, 1–19.
- Magwaza, L.S. & Opara, U.L. (2015). Analytical methods for determination of sugars and sweetness of horticultural products—A review. *Scientia Horticulturae*, **184**, 179–192.
- Mancera, J.A. (2010). *Diseño de una pulpa funcional de frutas y hortalizas con propiedades antioxidantes y probióticas (Tesis de maestría)*.
- Marques, D.M., Silva, A.B., Mantovani, J.R. & Pereira, D.S. (2018). Growth and physiological responses ... GROWTH AND PHYSIOLOGICAL RESPONSES OF TREE SPECIES (*Hymenaea courbaril* L ., *Peltophorum dubium* (Spreng .) Taub . and *Myroxylon peruiferum* L . F .) EXPOSED TO DIFFERENT COPPER CONCENTRATIONS IN THE SOIL 1 CRESCIMEN, **42**.
- Mckee, J.R. & Mckee, T. (2014). Metabolismo de los carbohidratos. In: *Bioquímica. Las bases moleculares de la vida*. (edited by 5e). Pp. 264–370. México D.F.: McGraw Hill.
- Medlicott, A.P. and Thompson, A.K. (1985). Analysis of sugars and organic acids in ripening mango fruit (*Mangifera indica* L. var. Keitt) by high performance liquid chromatography. *J. Sci. Food Agric.*, **36**, 561–566.
- Menezes, E., Deliza, R., Chan, H.L. & Guinard, J.X. (2011). Preferences and attitudes towards a??a??-based products among North American consumers. *Food Research International*, **44**, 1997–2008.
- MinAgricultura, M. de A. y D.R. de C. (2012). *Anuario estadístico de frutas y hortalizas*

- 2007-2011 y sus calendarios de siembras y cosechas*. Bogotá: Editorial JL Impresores LTDA.
- MinAgricultura, M. de A. y D.R. de C. (2013). Anuario estadístico del sector agropecuario [Internet document] .
- MinAgricultura, M. de A. y D.R. de C. (2014). Las pérdidas y el desperdicio alimentario generado por la producción agrícola de alimentos en España, 11.
- MinAgricultura, M. de A. y D.R. de C. (2015). Seguridad alimentaria. Cadenas productivas. Centrales mayoristas [Internet document] . *Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural*. URL http://corabastos.com.co/images/documents/FLA_001CADENAS_PRODUCTIVAS_CENTRALES_DE_ABASTO.pdf. Accessed 23/02/2018.
- MinAgricultura, M. de A. y D.R. de C., FNFH, F.N. de F.H., ASOHOFrucol & SAG. (2006). *Diagnóstico y Análisis de los Recursos para la Fruticultura en Colombia. Plan Frutícola Nacional de Colombia*.
- MinAgricultura, M. de A. y D.R. de C.O.A.C. (2005). *La industria procesadora de frutas y hortalizas en Colombia. Documento de trabajo 82*. Bogotá D.C.
- Ministerio de Agricultura y Pesca, A. y M.A. de E. (2016). Informe del consumo de alimentación en España.
- MinSalud, M. de S. y P.S. de C. (2013). Resolución 3929.
- MinSalud, M. de S. y P.S. de C. (2015a). Decálogo de una alimentación saludable [Internet document] URL <https://www.minsalud.gov.co/salud/Paginas/Alimentación-Saludable.aspx>. Accessed 24/08/2015.
- MinSalud, M. de S. y P.S. de C. (2015b). RESUMEN EJECUTIVO Primeros resultados de la Encuesta Nacional de la Situación Nutricional en Colombia ENSIN - 2015, 64.
- MinSalud, M. de S. y P.S. de C. & ICBF, I.C. de B.F. (1999). *Guías alimentarias para la población colombiana mayor de dos años*. Santafé de Bogotá, Colombia.
- Mizrahi, S. (2000). Accelerated shelf-life test. In: *The stability and shelf-life of food*. Cambridge.
- Mizrahi, S. (2011). Accelerated shelf life testing of foods. In: *Food and Beverage Stability and Shelf Life*. Pp. 657–682. Woodhead Publishing Limited.
- Morgado, C., Pestana, J.M., Guerra, M.M. & Brandao, C. (2018). Microbiological quality in convenient ready-to-eat vegetables during shelf life. *AIMS Agriculture and food*, **3**, 372–383.
- Moss, B.W. (2002). The chemistry of food colour. In: *Colour in food* (edited by D.B. MacDougall). Boca Raton: Woodhead Publishing Limited.
- Mussatto, S.I. & Mancilha, I.M. (2007). Non-digestible oligosaccharides: A review. *Carbohydrate Polymers*, **68**, 587–597.

- Naczek, M. & Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, **1054**, 95–111.
- Naczek, M. & Shahidi, F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **41**, 1523–1542.
- Naeem, A., Abbas, T., Mohsin, T. & Hasnain, A. (2018). Effect of guar gum coatings containing essential oils on shelf life and nutritional quality of green-unripe mangoes during low temperature storage. *International Journal of Biological Macromolecules*, **113**, 403–410.
- Nawirska-Olszańska, A., Biesiada, A., Sokół-Łętowska, A. & Kucharska, A.Z. (2014). Characteristics of organic acids in the fruit of different pumpkin species. *Food Chemistry*, **148**, 415–419.
- Nayak, B., Liu, R.H. & Tang, J. (2015). Effect of Processing on Phenolic Antioxidants of Fruits, Vegetables, and Grains—A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **55**, 887–919.
- Nazzaro, F., Fratianni, F., Coppola, R., Sada, A. & Orlando, P. (2009). Fermentative ability of alginate-prebiotic encapsulated *Lactobacillus acidophilus* and survival under simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Functional Foods*, **1**, 319–323.
- Nelson, D.L. & Cox, M.M. (2004). *Lehninger. Principles of biochemistry*. Fourth Edi.
- Nicoli, M.C., Anese, M. & Parpinel, M. (1999). Influence of processing on the antioxidant properties of fruit and vegetables. *Trends Food Sci. Technol.*, **10**, 94–100.
- Nicoli, M.C., Anese, M., Parpinel, M.T., Franceschi, S. & Lerici, C.R. (1997). Loss and/or formation of antioxidants during food processing and storage. *Cancer Letters*, **114**, 71–74.
- Nychas, G.-J.E., Skandamis, P.N., Tassou, C.C. & Koutsoumanis, K.P. (2008). Meat spoilage during distribution. *Meat Science*, **78**, 77–89.
- Nychas, G. & Panagou, E. (2011). *Microbiological spoilage of foods and beverages. Food and Beverage Stability and Shelf Life*. Woodhead Publishing Limited.
- Oliveira, R.P. de S., Torres, B.R., Perego, P., Oliveira, M.N. de & Converti, A. (2012). Co-metabolic models of *Streptococcus thermophilus* in co-culture with *Lactobacillus bulgaricus* or *Lactobacillus acidophilus*. *Biochemical Engineering Journal*, **62**, 62–69.
- Oliveira, R.P.D.S., Perego, P., Converti, A. & Oliveira, M.N. De. (2009). Effect of inulin on growth and acidification performance of different probiotic bacteria in co-cultures and mixed culture with *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Food Engineering*, **91**, 133–139.
- Palazo, M.A., Pérez-Conesa, D., Abella, P., Ros, G., Romero, F. & Vidal, M.L. (2009). Determination of shelf-life of homogenized apple-based beikost storage at different temperatures using Weibull hazard model. *LWT - Food Science and Technology*, **42**, 319–326.
- Panagou, E.Z., Schillinger, U., Franz, C.M.A.P. & Nychas, G.-J.E. (2008). Microbiological

- and biochemical profile of cv. Conservolea naturally black olives during controlled fermentation with selected strains of lactic acid bacteria. *Food microbiology*, **25**, 348–58.
- Park, J. & Floch, M.H. (2007). Prebiotics, Probiotics, and Dietary Fiber in Gastrointestinal Disease. *Gastroenterology Clinics of North America*, **36**, 47–63.
- Parra-Huertas, R. a. (2010). Bacterias Ácido Lácticas: papel funcional en los alimentos. *Facultad de ciencias agropecuarias*, **8**, 93–105.
- Paul Ross, R., Morgan, S. & Hill, C. (2002). Preservation and fermentation: past, present and future. *International Journal of Food Microbiology*, **79**, 3–16.
- Pavan, M., & Worth, A. (2008). A set of case studies to illustrate the applicability of DART (Decision Analysis by Ranking Techniques) in the ranking of chemicals. *European Commission report EUR23481 EN. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg. Available online at: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/computational_toxicology/doc/EUR_23481_EN.pdf*, 80.
- Pereira, A.L.F., Feitosa, W.S.C., Abreu, V.K.G., Lemos, T. de O., Gomes, W.F., Narain, N. & Rodrigues, S. (2017). Impact of fermentation conditions on the quality and sensory properties of a probiotic cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) beverage. *Food Research International*, **100**, 603–611.
- Piano, M. Del, Morelli, L., Strozzi, G.P., Allesina, S., Barba, M., Deidda, F., Lorenzini, P., Ballaré, M., Montino, F., Orsello, M., Sartori, M., Garelo, E., Carmagnola, S., Pagliarulo, M. & Capurso, L. (2006). Probiotics: from research to consumer. *Digestive and Liver Disease*, **38**, 248–255.
- Pinheiro, N.M. de S., Figueiredo, E.A.T. de, Figueiredo, R.W. de, Maia, G.A. & Souza, P.H.M. de. (2005). Avaliação da qualidade microbiológica de frutos minimamente processados comercializados em supermercados de Fortaleza. *Revista Brasileira de Fruticultura*, **27**, 153–156.
- Portafolio. (2017a). FAO destaca importancia de Colombia como despensa alimentaria [Internet document] . *Periódico económico Portafolio* URL <http://www.portafolio.co/economia/fao-destaca-importancia-de-colombia-como-despensa-alimentaria-507995>. Accessed 08/11/2017.
- Portafolio. (2017b). Cómo convertirse en la nueva despensa del planeta [Internet document] . *Periódico económico Portafolio* URL <http://www.portafolio.co/economia/como-convertirse-en-la-nueva-despensa-del-planeta-507969>. Accessed 08/11/2017.
- Poveda Núñez, M.C. (2014). *Determinación de la influencia de las zonas de producción sobre el contenido de componentes bioactivos y la capacidad antioxidante de cinco frutas andinas*.
- Priecina, L. & Karklina, D. (2015). Composition of Major Organic Acids in Vegetables and Spices, 447–454.
- Prior R.L.; Wu X., S.K. (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of agricultural*

- and food chemistry*, **53**, 4290–4302.
- Prior, R.L., Sintara, M. & Chang, T. (2016). Multi-radical (ORACMR5) antioxidant capacity of selected berries and effects of food processing. *Journal of Berry Research*, **6**, 159–173.
- Procolombia. (2017a). Acuerdo Comercial Colombia - Unión Europea. Oportunidad por sector. Agroindustria. [Internet document] URL <http://ue.procolombia.co/oportunidad-por-sector/agroindustria>. Accessed 23/02/2018.
- Procolombia. (2017b). Acuerdo Comercial Colombia - Unión Europea. Oportunidad por sector. Frutas y hortalizas procesadas [Internet document] URL <http://ue.procolombia.co/oportunidad-por-sector/agroindustria/frutas-y-hortalizas-procesadas>. Accessed 23/02/2018.
- Procolombia. (2017c). Acuerdo Comercial Colombia - Unión Europea. Oportunidad por sector. Frutas frescas. [Internet document] URL <http://ue.procolombia.co/oportunidad-por-sector/agroindustria/frutas-frescas>. Accessed 23/02/2018.
- Putnik, P., Bursa, D., Herceg, K., Roohinejad, S., Greiner, R., Bekhit, A.E.A. & Levaj, B. (2017). Modelling the shelf-life of minimally-processed fresh-cut apples packaged in a modified atmosphere using food quality parameters *cevi*, **81**, 55–64.
- Quicazán, M.C. (2012). *Aplicación de fermentación láctica como alternativa en el desarrollo de bebidas de soya en Colombia / Application of lactic fermentation as an alternative in the development of soy beverages in Colombia*.
- Rawson, a., Patras, a., Tiwari, B.K., Noci, F., Koutchma, T. & Brunton, N. (2011). Effect of thermal and non thermal processing technologies on the bioactive content of exotic fruits and their products: Review of recent advances. *Food Research International*, **44**, 1875–1887.
- Razzaq, K., Singh, Z., Khan, A.S., Khan, S.A.K.U. & Ullah, S. (2016). Role of 1-MCP in regulating 'Kensington Pride' mango fruit softening and ripening. *Plant Growth Regulation*, **78**, 401–411.
- Reddy, L.V., Min, J.H. & Wee, Y.J. (2015). Production of probiotic mango juice by fermentation of lactic acid bacteria. *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology*, **43**.
- Reid, G. (2016). Probiotics: Definition, scope and mechanisms of action. *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology*, **30**.
- Rinaldi, M., Caligiani, A., Borgese, R., Palla, G., Barbanti, D. & Massini, R. (2013). The effect of fruit processing and enzymatic treatments on pomegranate juice composition, antioxidant activity and polyphenols content. *LWT - Food Science and Technology*, **53**, 355–359.
- Rivera-Espinoza, Y. & Gallardo-Navarro, Y. (2010). Non-dairy probiotic products. *Food microbiology*, **27**, 1–11.
- Rodríguez, H., Curiel, J.A., Landete, J.M., las Rivas, B. de, Felipe, F.L. de, Gómez-Cordovés, C., Mancheño, J.M., Muñoz, R., López de Felipe, F., Gómez-Cordovés,

- C., Mancheño, J.M. & Muñoz, R. (2009). Food phenolics and lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, **132**, 79–90.
- Rodriguez, M.A.R., Oderiz, M.L. V, Hernandez, J.L. & Lozano, J.S. (1992). Determination of vitamin-C and organic-acids in various fruits by HPLC. *J Chromatogr Sci*, **30**, 433–437.
- Salas, F. (2015). Curso de vida útil de los alimentos. Bogotá D.C.
- Sant'Anna, V., Gurak, P.D., Ferreira Marczak, L.D. & Tessaro, I.C. (2013). Tracking bioactive compounds with colour changes in foods - A review. *Dyes and Pigments*, **98**, 601–608.
- Santas, J., Carbó, R., Gordon, M.H. & Almajano, M.P. (2008). Comparison of the antioxidant activity of two Spanish onion varieties. *Food Chemistry*, **107**, 1210–1216.
- Santos, M.I., Correia, C., Campos, M.I., Saraiva, M.M. & Novais, M.R. (2005). Valores Guia para avaliação da qualidade microbiológica de alimentos prontos a comer preparados em estabelecimentos de restauração. *Rev. Ordem Dos. Farm*, **64**, 66–68.
- Senior, A. (2007). Posibilidades del mercado mundial de frutas. In: *Memorias Primer simposio colombiano sobre Producción, Agroindustria y Comercialización de frutas tropicales* (edited by P. Montañó de Mayolo & J. Toro). Pp. 125–131. Cali: Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – CORPOICA.
- Septembre-Malaterre, A., Remize, F. & Poucheret, P. (2018). Fruits and vegetables, as a source of nutritional compounds and phytochemicals: Changes in bioactive compounds during lactic fermentation. *Food Research International*, **104**, 86–99.
- Serrazanetti, D.I., Guerzoni, M.E., Corsetti, A. & Vogel, R. (2009). Metabolic impact and potential exploitation of the stress reactions in lactobacilli. *Food microbiology*, **26**, 700–711.
- Shahidi, F. & Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects - A review. *Journal of Functional Foods*, **18**, 820–897.
- Sharma, V. & Mishra, H.N. (2014). Unstructured kinetic modeling of growth and lactic acid production by *Lactobacillus plantarum* NCDC 414 during fermentation of vegetable juices. *LWT - Food Science and Technology*, **59**, 1123–1128.
- Shi, A., Mou, B. & Correll, J.C. (2016). Association analysis for oxalate concentration in spinach. *Euphytica*, **212**, 17–28.
- Siegrist, M., Shi, J., Giusto, A. & Hartmann, C. (2015). Worlds apart. Consumer acceptance of functional foods and beverages in Germany and China. *Appetite*, **92**, 87–93.
- Siener, R., Seidler, A., Voss, S. & Hesse, A. (2016). The oxalate content of fruit and vegetable juices, nectars and drinks. *Journal of Food Composition and Analysis*, **45**, 108–112.

- Silva Sabo, S. da, Vitolo, M., González, J.M.D. & Oliveira, R.P. de S. (2014). Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. *Food Research International*, **64**, 527–536.
- Sim, B., Producto, P. De & Octubre, N. (2001). Perfil de producto bebidas a base de frutas, 1–23.
- Singh, A.K., Singh, C.P., Kushwaha, P.S. & Chakraborty, B. (2015). Efficacy of postharvest treatments on fruit marketability and physico-chemical characteristics of “Dashehari” mango. *Acta Horticulturae*, **1066**, 201–206.
- Siroli, L., Patrignani, F., Serrazanetti, D.I., Tabanelli, G., Montanari, C., Gardini, F. & Lanciotti, R. (2015). Lactic acid bacteria and natural antimicrobials to improve the safety and shelf-life of minimally processed sliced apples and lamb’s lettuce. *Food microbiology*, **47**, 74–84.
- Smigic, N., Djekic, I., Martins, M.L., Rocha, A., Sidiropoulou, N. & Kalogianni, E.P. (2016). The level of food safety knowledge in food establishments in three European countries. *Food Control*, **63**, 187–194.
- Soares, F.D., Pereira, T., Maio Marques, M.O. & Monteiro, A.R. (2007). Volatile and non-volatile chemical composition of the white guava fruit (*Psidium guajava*) at different stages of maturity. *Food Chemistry*, **100**, 15–21.
- Sodini, I., Latrille, E. & Corrieu, G. (2000). Identification of interacting mixed cultures of lactic acid bacteria by their exclusion from a model predicting the acidifying activity of non-interacting mixed cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **54**, 715–718.
- Sousa, M.J. & Mahajan, P. V. (2011). Modelling chemical and physical deterioration of foods and beverages. In: *Food and Beverage Stability and Shelf Life*. Pp. 657–682. Woodhead Publishing Limited.
- Tafur, R. & Toro, J. (2007). Presente y futuro de la fruticultura colombiana. In: *Memorias Primer simposio colombiano sobre Producción, Agroindustria y Comercialización de frutas tropicales* (edited by P. Montaña de Mayolo & J. Toro). Pp. 9–22. Cali: Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – CORPOICA.
- Taoukis, P.S., Labuza, T.P. & Saguy, I.S. (1997). Kinetics of food deterioration and shelf-life prediction. In: *The handbook of food engineering practice*. Pp. 1–75. CRC Press.
- Tetteh, M.M. (2012). ¿ Qué es el Estrés Oxidativo ? *Environmental Health Fact Sheet*, 2.
- Ureña Peralta, M. & D’Arrigo Huapaya, M. (1999). *Evaluación sensorial de los alimentos*. Primera Ed. Lima, Perú: Editorial Agraria. Universidad Nacional Agraria La Molina.
- Urieles, R. (2018). Montañas de mango se pudren en Ciénaga por la falta de compradores. *Periódico El Tiempo*.
- Urieles, R. (2019). Las montañas de mango que se pudren en Magdalena por olvido del Estado. *Periódico El Tiempo*.
- Valero, A., Carrasco, E. & García-Gimeno, R.M. (2012). Principles and Methodologies for

- the Determination of Shelf – Life in Foods. In: *Trends in Vital Food and Control Engineering*. Pp. 3–42. Rijeka.
- Vasconcellos, J., Conte-Junior, C., Silva, D., Pierucci, A.P., Paschoalin, V. & Alvares, T.S. (2016). Comparison of total antioxidant potential, and total phenolic, nitrate, sugar, and organic acid contents in beetroot juice, chips, powder, and cooked beetroot. *Food Science and Biotechnology*, **25**, 79–84.
- Vasiljevic, T., Shah, N.P. & Jelen, P. (2005). Growth characteristics of *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* ATCC 11842 as affected by different neutralisers. *Australian Journal of Dairy Technology*, **60**, 3–9.
- Venereo Gutiérrez, J.R. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar*, **31**, 126–133.
- Vijaya Kumar, B., Vijayendra, S.V.N. & Reddy, O.V.S. (2015). Trends in dairy and non-dairy probiotic products - a review. *Journal of Food Science and Technology*.
- Vijayakumar, J., Aravindan, R. & Viruthagiri, T. (2008). Recent Trends in the Production , Purification and Application of Lactic Acid. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, **2**, 245–264.
- Villadsen, J., Nielsen, J. & Lidén, G. (2011). *Bioreaction Engineering Principles*. Thrid Edit. New York, NY: Springer New York.
- Villasante, J., Girbal, M., Metón, I. & Almajano, M.P. (2019). Effects of pecan nut (*Carya illinoensis*) and roselle flower (*Hibiscus sabdariffa*) as antioxidant and antimicrobial agents for sardines (*Sardina pilchardus*). *Molecules*.
- Vitali, B., Minervini, G., Rizzello, C.G., Spisni, E., Maccaferri, S., Brigidi, P., Gobbetti, M. & Cagno, R. Di. (2012). Novel probiotic candidates for humans isolated from raw fruits and vegetables. *Food microbiology*, **31**, 116–25.
- Wang, J., Zhou, Y., Dong, C., Shen, Q. & Putheti, R. (2009). Effects of NH₄⁺ / NO₃⁻ - N ratios on growth , nitrate uptake and organic acid levels of spinach (*Spinacia oleracea* L .), **8**, 3597–3602.
- Wang, W. (2018). Shelf - life prediction of strawberry at different temperatures during storage using kinetic analysis and model development. *Journal of Food Processing and Preservation*, **42**, 1–9.
- Wolf Tasca Del’Arco, A.P. & Sylos, C.M. De. (2017). Effect of industrial processing for obtaining guava paste on the antioxidant compounds of guava (*Psidium guajava* L .) ‘ Paluma ’ cv . Efeito do processamento industrial para obtenção de goiabada sobre os compostos antioxidantes da goiaba (*Psidium guajav*, 1–10.
- Wruss, J., Waldenberger, G., Huemer, S., Uygun, P., Lanzerstorfer, P., Müller, U., Höglinger, O. & Weghuber, J. (2015). Compositional characteristics of commercial beetroot products and beetroot juice prepared from seven beetroot varieties grown in Upper Austria. *Journal of Food Composition and Analysis*, **42**, 46–55.
- Wu, H.Y., Yang, K.M. & Chiang, P.Y. (2018). Roselle anthocyanins: Antioxidant properties and stability to heat and pH. *Molecules*, **23**.

- Yang, J., Ji, Y., Park, H., Lee, J., Park, S., Yeo, S., Shin, H. & Holzapfel, W.H. (2014). Selection of functional lactic acid bacteria as starter cultures for the fermentation of Korean leek (*Allium tuberosum* Rottler ex Sprengel.). *International journal of food microbiology*, **191**, 164–71.
- Yoon, K.Y., Woodams, E.E. & Hang, Y.D. (2005). Fermentation of beet juice by beneficial lactic acid bacteria. *LWT - Food Science and Technology*, **38**, 73–75.
- Zaldívar, C.P. (2003). Las frutas y hortalizas como alimentos funcionales. *Contactos*, **47**, 12–19.
- Zhang, J., Zhang, Y. & Cao, L. (2016). Combined Effects of Water and Nitrogen on Growth, Biomass, and Quality of Spinach (*Spinacia oleracea* Linn.). *COMMUNICATIONS IN SOIL SCIENCE AND PLANT ANALYSIS*, **47**, 32–40.
- Zhang, Y., Chen, X., Qi, B., Luo, J., Shen, F., Su, Y., Khan, R. & Wan, Y. (2014). Improving lactic acid productivity from wheat straw hydrolysates by membrane integrated repeated batch fermentation under non-sterilized conditions. *Bioresource technology*, **163**, 160–6.
- Zhang, Z.Y., Jin, B. & Kelly, J.M. (2007). Production of lactic acid from renewable materials by *Rhizopus* fungi. *Biochemical Engineering Journal*, **35**, 251–263.
- Zhou, C.L., Mi, L., Hu, X.Y. & Zhu, B.H. (2017). Evaluation of three pumpkin species: correlation with physicochemical, antioxidant properties and classification using SPME-GC–MS and E-nose methods. *Journal of Food Science and Technology*, **54**, 3118–3131.

ANEXO A. Análisis estadístico de ordenamiento. Conveniencia vs Utilidad

Los métodos de ordenamiento permiten organizar una serie de muestras considerando de forma simultánea más de un criterio. El fundamento de este método consiste en combinar los diferentes criterios en un índice de ordenamiento global, con el fin de tener un indicador único que permita realizar la clasificación. Para ello se definen las funciones de conveniencia y utilidad.

Se define una función de valor parcial; es decir, una función de transformación t , para cada criterio con el fin de estandarizar las funciones de valor parcial que transforman los valores de los criterios a la misma escala. Normalmente, las mejores y las peores condiciones deben definirse para cada criterio. Esto se puede hacer tomando simplemente la mejor y la peor de las alternativas disponibles, o de forma general, como las mejores y las peores condiciones posibles en contextos similares.

Para este propósito, se pueden utilizar diferentes tipos de funciones, las más comunes son lineales, sigmoideas, logarítmicas, exponenciales, de pasos, normales, parabólicas, de Laplace, triangulares y de caja. Cada criterio se transforma independientemente en una utilidad / conveniencia t_{ij} por una función arbitraria que transforma el valor real f_{ij} de cada i -th alternativa para el criterio j -th en un valor entre 0 y 1. Una vez que se ha definido el tipo de función y su tendencia para cada criterio, se calcula la utilidad/conveniencia general de cada i -ésima alternativa. La mejor alternativa será la que tenga el máximo valor de conveniencia y utilidad.

Se definen la utilidad (U) y la conveniencia (D) como:

$$U_i = \sum_{j=1}^p w_j \cdot t_{ij} \quad 0 \leq U_i \leq 1$$

$$D_i = t_{i1}^{w_1} \cdot t_{i2}^{w_2} \cdot \dots \cdot t_{ip}^{w_p} \quad 0 \leq D_i \leq 1$$

Dónde:

U : valor de utilidad de la i -ésima alternativa o tratamiento.

p : número de variables.

w : el peso o valor asignado por el analista a cada criterio.

t : valor obtenido en la función de transformación.

Se puede observar que la conveniencia general se calcula más severamente que la utilidad: de hecho, si un elemento es deficiente con respecto a un criterio, su conveniencia general será

deficiente. Si cualquier D_i deseable es igual a 0, la conveniencia global será cero, mientras que si el D_i será igual a uno solo si todos los deseables tienen el valor máximo de uno.

Una vez que se ha calculado la utilidad general U_i o la conveniencia D_i para cada alternativa, todas las alternativas se pueden clasificar totalmente según sus valores U o D y el elemento con la U o D más alta se puede seleccionar como el mejor, si su valor es considerado aceptable. La tabla A-1 desarrollada por Harrington (1965) presenta una escala para los diferentes valores de conveniencia. Las funciones de utilidad y conveniencia se ven afectadas por la arbitrariedad relacionada con la selección previa de las funciones de valor parcial y los límites superior e inferior correspondientes.

Tabla A-1. Definición cualitativa de la escala de deseabilidad según Harrington

Escala	Valor de conveniencia
1,00	El mejor
1.00 – 0.80	Aceptable y excelente
0.80 – 0.63	Aceptable y Bueno
0.63 – 0.40	Aceptable pero pobre
0.40 – 0.30	En el límite
0.30 – 0.00	Inaceptable
0.00	Completamente inaceptable

Fuente bibliográfica: (Pavan, M., & Worth, 2008)

ANEXO B. Rectas de calibración de los métodos analíticos empleados.

Rectas de HPLC

Los tiempos de retención obtenidos para cada compuesto así como las rectas de calibración se presentan en la Tabla 1A.

Tabla 1A. Tiempos de retención y rectas de calibración para la detección y cuantificación de carbohidratos.

Carbohidrato	Tiempo de retención (min)	Recta de calibración ⁷	Coefficiente de correlación (R ²)
Sacarosa	8.5	$y = 8.6216 \times 10^{-6} x$	0.9975
Glucosa	10.3	$y = 5.5263 \times 10^{-6} x$	0.9995
Fructosa	13.2	$y = 4.4109 \times 10^{-6} x$	0.9998

Los tiempos de retención obtenidos para cada compuesto así como las rectas de calibración que se emplearon para la cuantificación se presentan en la Tabla 2A.

Tabla 2A. Tiempos de retención y rectas de calibración para la detección y cuantificación de ácidos orgánicos.

Ácido orgánico	Tiempo de retención (min)	Recta de calibración ⁸	Coefficiente de correlación (R ²)
Oxálico	6.0 – 8.0	$y = 1.4537 \times 10^{-7} x + 1.3010 \times 10^{-2}$	0.9939
Cítrico	8.5 – 9.5	$y = 1.4838 \times 10^{-6} x + 1.5168 \times 10^{-3}$	0.9965
Tartárico	9.0 – 10.0	$y = 1.0491 \times 10^{-6} x + 1.2733 \times 10^{-3}$	0.9999
Málico ⁹	10.0 – 11.0 y 14.0 – 15.5	$y = 8.0690 \times 10^{-7} x + 5.7036 \times 10^{-4}$	0.9984
Ascórbico	11.0 – 11.5	$y = 1.2261 \times 10^{-7} x + 7.4443 \times 10^{-4}$	0.9967
Succínico	13.0 – 13.5	$y = 2.3008 \times 10^{-6} x + 2.6985 \times 10^{-3}$	0.9976
Láctico ⁵	12.0 – 13.0 y 13.0 – 15.0	$y = 1.8698 \times 10^{-6} x + 3.0124 \times 10^{-3}$	0.9979
Propiónico	19.5 – 20.0	$y = 2.9616 \times 10^{-6} x + 1.2019 \times 10^{-3}$	0.9968
Maleico	7.5 – 8.5	----	----
Acético	16.0 – 17.0	----	----

⁷ y: concentración en (g/L); x: área de integración.

⁸ y: concentración en (g/L); x: área de integración.

⁹ Del análisis resultan dos picos correspondientes a los isómeros D y L

Rectas de antioxidantes

Las rectas de calibración empleadas para las técnicas analíticas para la determinación de la actividad antirradicalaria se presentan en la Tabla 3A.

Tabla 3A. Rectas de calibración para la determinación de actividad antirradicalaria.

Técnica	Patrón de referencia	Recta de calibración	Coefficiente de correlación (R ²)
Folin Ciocalteu	Ácido gálico	$y = 1.3529 x + 7.7824 \times 10^{-3}$	0.9978
DPPH	Trolox	$y = 8.9403 \times 10^{-4} x + 5.6103 \times 10^{-3}$	0.9932
ABTS	Trolox	$y = 2.3516 \times 10^{-3} x - 2.5829 \times 10^{-2}$	0.9962
FRAP	Trolox	$y = 3.5816 \times 10^{-3} x - 1.7705 \times 10^{-2}$	0.9952
ORAC	Trolox	$y = 2.8788 \times 10^{-1} x - 6.9676$	0.9975

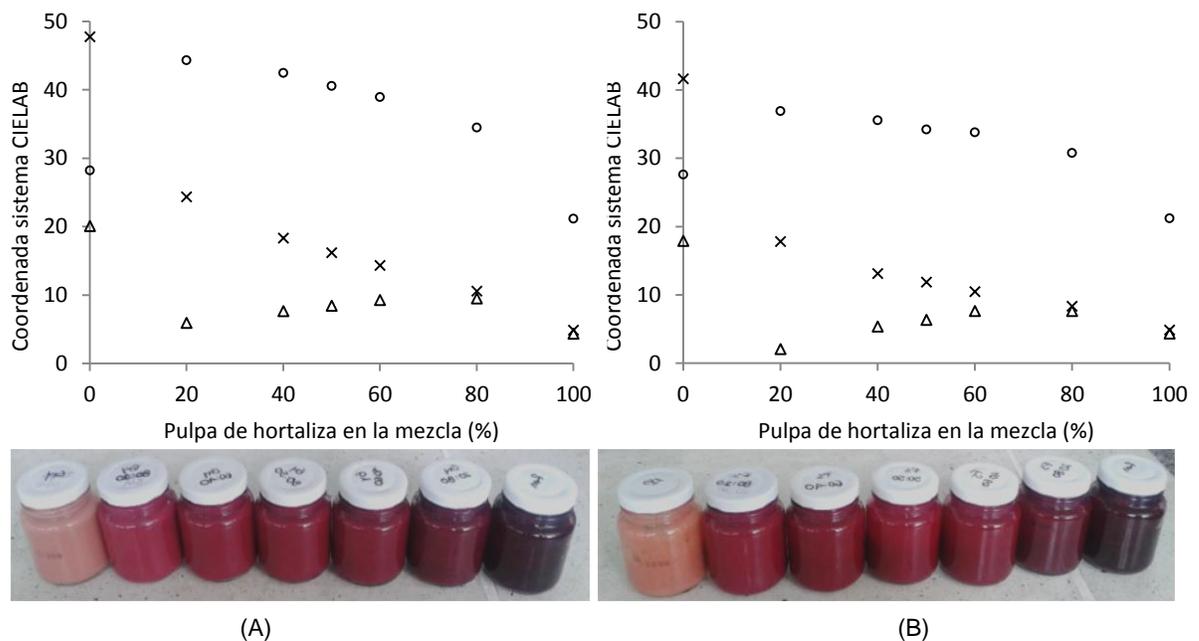
ANEXO C. Resultados de caracterización de mezclas

Caracterización de pulpas rojas

Las pulpas rojas se obtuvieron a partir de la mezcla de pulpa de remolacha con pulpas de tres frutas: guayaba, fresa o mora, en diferentes proporciones (ver Tabla 3-8). Los resultados de la caracterización de estas pulpas en las propiedades fisicoquímicas empleadas como variables de respuesta se presentaron anteriormente. Se observan valores de pH bajos para las frutas y alto para la remolacha, mientras que los valores para la acidez titulable es mayor para la fresa y la mora. Los valores para los sólidos solubles y los totales son mayores para la fresa y similares en la remolacha y la mora. A pesar de que en la guayaba se tiene el mayor valor de sólidos totales, se tiene el menor valor de sólidos solubles.

Determinación instrumental del color en las mezclas

La figura C-1 presenta los resultados de la determinación del color para las mezclas de guayaba y fresa con remolacha.



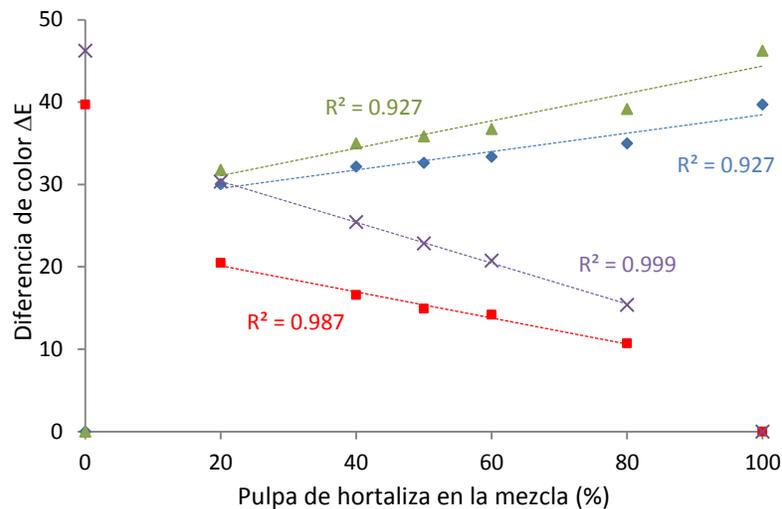
Coordenadas en el sistema CIELAB: $L^*(x)$, $a^*(o)$, $b^*(\Delta)$.

Figura C-1. Caracterización instrumental del color para las mezclas de pulpas de (A) guayaba – remolacha y (B) fresa - remolacha

El comportamiento del color en estas dos mezclas es similar, ya que la principal diferencia se presenta en la coordenada L^* , mostrando una mayor luminosidad en la pulpa de guayaba. En las dos mezclas se observa un comportamiento lineal con respecto a la proporción de pulpa de remolacha. Por lo tanto, puede decirse que esta hortaliza tiene una mayor influencia sobre el color de la mezcla, y que una pequeña adición de su pulpa puede modificar considerablemente el color de la mezcla.

Las diferencias absolutas de color (ΔE) de cada una de las mezclas obtenidas, tomando como referencia la pulpa de fruta (fresa o guayaba) o de remolacha, se presentan en la Figura C-2. En todos los casos la tendencia es lineal.

Al tener como referencia la pulpa de fruta (fresa o guayaba) las pendientes son positivas, mientras que al calcularlas en relación con la pulpa de remolacha, son negativas. Las diferencias de color son mayores para las mezclas con guayaba que cuando se emplea fresa. Considerando que la tendencia lineal llega hasta la pulpa de remolacha podría afirmarse que ésta tiene una mayor influencia en el color de la mezcla que la pulpa de fruta (ya sea de guayaba o de fresa).



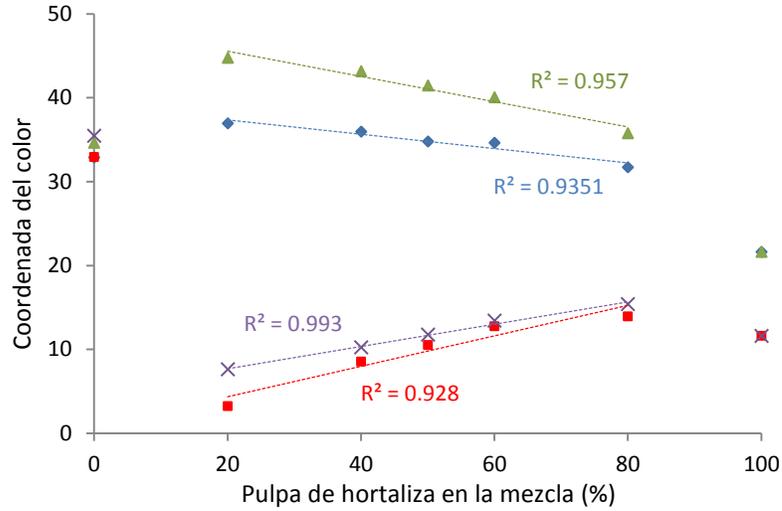
ΔE entre mezclas con guayaba y: guayaba (\blacktriangle); remolacha (\times).

ΔE entre mezclas con fresa y: fresa (\blacklozenge); remolacha (\blacksquare).

Figura C-2. Diferencias de color en las mezclas en relación con el color de la pulpa de guayaba, fresa o remolacha

En la Figura C-3 se presentan los resultados en coordenadas radiales en función del porcentaje de hortaliza, lo que permite evaluar los cambios en la cromaticidad. De nuevo hay una fuerte linealidad ($0.92 < R^2 < 0.99$). Para la tonalidad o matiz (h) la pendiente es positiva, mientras que para la saturación o *chroma* (C^*) la pendiente es negativa.

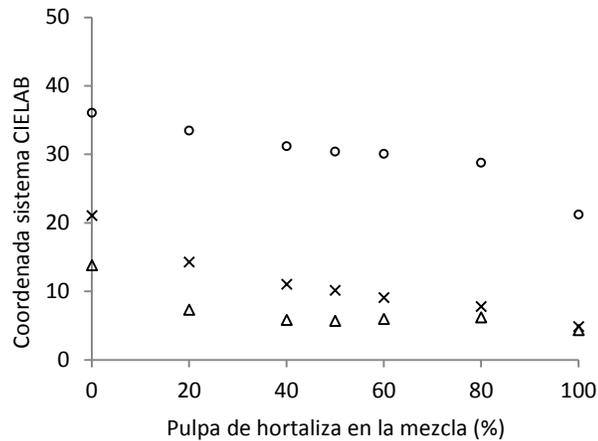
En todos los casos los valores de las coordenadas de color para las mezclas con guayaba son superiores que cuando se emplea fresa. Cabe destacar que los puntos que no pertenecen a las mezclas (pulpas de frutas o remolacha puras) no hacen parte de la tendencia lineal de las mezclas. En el caso de las pulpas de fresa y de guayaba los valores de la tonalidad y saturación son muy similares, mientras que en el caso de la pulpa de remolacha la diferencia es mayor.



Mezcla guayaba – remolacha: h(X); C*(▲). Mezcla fresa – remolacha: h(■); C*(◆).

Figura C-3. Propiedades del color en las mezclas pulpas de frutas y remolacha

La Figura C-4 presenta las coordenadas para la determinación de color de la mezcla de mora y remolacha. Se observa que el comportamiento del color para las tres coordenadas tiende a la linealidad. La influencia de la adición de pulpa de remolacha sobre del color de las mezclas no es tan determinante en comparación con el comportamiento anteriormente descrito para las mezclas con guayaba y fresa, ya que para la pulpa de mora la luminosidad (L*) es menor y su color rojo es mayor (mayor valor para la coordenada cromática a*, rojo/verde).



Coordenadas en el sistema CIELAB: L*(◆), a*(■), b*(▲).

Figura C-4. Caracterización instrumental del color en pulpa de mora y remolacha.

También se calcularon las diferencias absolutas de color entre las mezclas y las pulpas de mora y remolacha, así como las propiedades de cromaticidad en función del porcentaje de remolacha.

Los resultados se presentan en la Figura C-5. Las diferencias de color tienen una tendencia lineal (A). Sin embargo, las diferencias son mayores en comparación con la pulpa de mora (mínimo 30) y tienen pendiente positiva, mientras que en relación con la pulpa de remolacha el comportamiento es opuesto (máximo 20).

En la cromaticidad (Figura C-5 (B)) se observa una tendencia lineal que excluye a las pulpas de mora y de remolacha (puras). La tonalidad (h) aumenta con la adición de remolacha (pendiente positiva), mientras que la saturación (C^*) disminuye (pendiente negativa). En el caso de la pulpa de mora los valores para estas propiedades son muy similares (alrededor de 35) y en el caso de la pulpa de remolacha la diferencia es mayor.

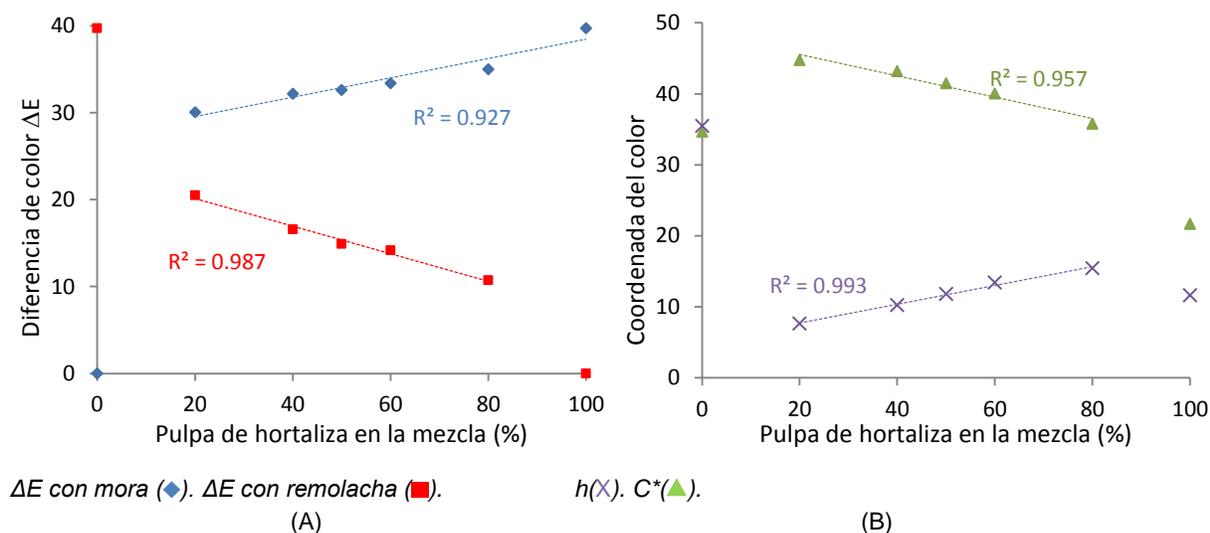


Figura C-5 (A) Diferencias de color en las mezclas de mora - remolacha en relación con el color de la pulpa de mora o remolacha. (B) Propiedades del color en las mezclas de mora – remolacha.

Caracterización de pH y acidez titulable de las mezclas

Al mezclar pulpas de frutas y hortalizas es posible que se presenten interacciones entre los compuestos de cada una de ellas. Las principales variaciones que se pueden observar en la caracterización de las pulpas (pH, acidez titulable, sólidos solubles y totales) están relacionadas con la composición de ácidos orgánicos y carbohidratos. Si no se presenta ninguna interacción, se espera un comportamiento lineal para estas propiedades; es decir, el cambio en las características de la pulpa de fruta debe ser proporcional a la cantidad de pulpa de hortaliza adicionada. Sin embargo, se espera linealidad para la concentración de (H^+) en la solución. Por lo tanto, al considerar el pH, el comportamiento de los valores determinados no será lineal.

Caracterización de sólidos solubles y totales de las mezclas

En la Figura C-7 se presenta la determinación de los sólidos solubles y los sólidos totales para las pulpas rojas en función de la proporción de remolacha en la mezcla. En las dos propiedades el comportamiento tiende a la linealidad. Para los sólidos solubles se observa una pendiente positiva en la guayaba, mientras que en fresa y mora la pendiente es negativa. Este comportamiento

depende considerablemente de la concentración de sólidos solubles que tiene la pulpa de remolacha. Las pendientes negativas, indican que las pulpas de frutas aportan más sólidos solubles o totales que la pulpa de remolacha.

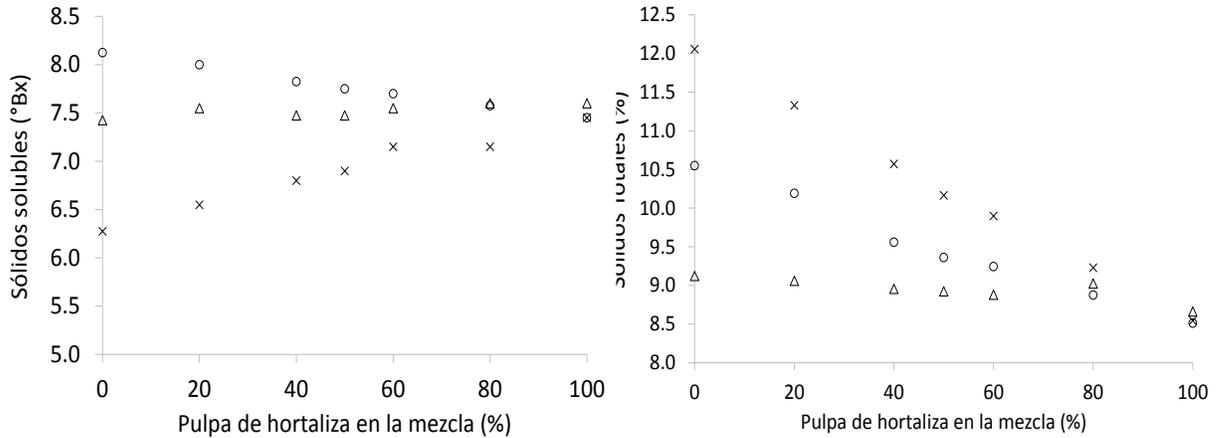


Figura C-7. Caracterización de mezclas de pulpas rojas (A) sólidos solubles y (B) sólidos totales.

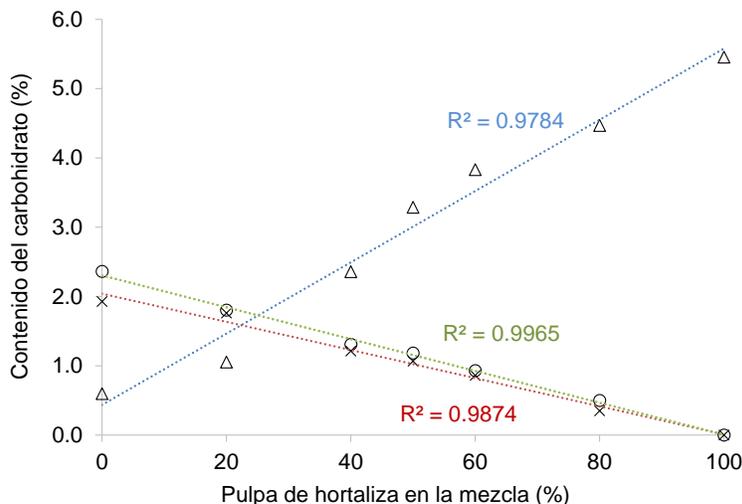
Al analizar las dos gráficas simultáneamente se hace evidente que el hecho de tener una mayor cantidad de sólidos totales no implica que mayores valores de sólidos solubles. Por ejemplo, la pulpa de guayaba tiene una mayor cantidad de sólidos totales y una menor cantidad de sólidos solubles, respecto a las de fresa y mora. Esto se debe a que al determinar la cantidad de sólidos totales también se incluyen todos los componentes de la pulpa (fibras, proteínas, ácidos, pectinas, etc.) diferentes del agua, sean o no solubles.

Cabe destacar que las sustancias solubles en el sustrato se encuentran más disponibles para el aprovechamiento de los microorganismos, por lo que el potencial para la fermentación es mayor al aumentar los sólidos solubles. A pesar de que la influencia de los sólidos totales es menor, también tiene efecto sobre el potencial fermentativo.

Caracterización de carbohidratos

Se realizó una caracterización del contenido de algunos carbohidratos (sacarosa, glucosa y fructosa) presentes en remolacha, guayaba y en las diferentes mezclas obtenidas a partir de estas dos pulpas. Los resultados de la caracterización se presentan en la Figura C-8.

Se observa un comportamiento lineal para los tres carbohidratos evaluados determinado por la proporción de la remolacha presente en la mezcla. Esta tendencia permite comprobar que no se presenta hidrólisis de la sacarosa (detallada en la Figura C-9) por la acción de los ácidos presentes en la fruta, posiblemente debido a que no se realiza ningún tratamiento térmico que le proporcione la suficiente energía de activación al sistema para efectuar la reacción. Por lo tanto, se mantiene el equilibrio entre los carbohidratos de las pulpas antes y después de realizar la mezcla.



Sacarosa (Δ), Fructosa (\circ), Glucosa (\times).

Figura C-8. Determinación del contenido de carbohidratos en la mezcla de guayaba y remolacha.

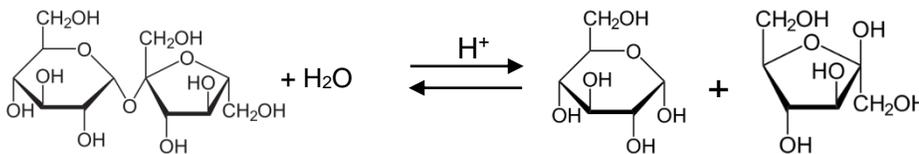


Figura C-9. Esquema de la hidrólisis de la sacarosa en glucosa y fructosa.

Considerando que la principal fuente de energía en los organismos vivos es la glucosa (la cual se metaboliza y sintetiza por diferentes rutas metabólicas como la glucólisis, glucogénesis, glucogenólisis y gluconeogénesis) se esperaría que bacterias lácticas crezcan y se mantengan viables en las pulpas con un mayor contenido de glucosa y sacarosa, ya que poseen una fuente de carbono más disponible.

Caracterización de ácidos orgánicos

Se realizó una identificación y cuantificación de los principales ácidos orgánicos presentes en las pulpas de remolacha, guayaba y en la mezcla seleccionada (40% de pulpa de guayaba y 60% de pulpa de remolacha). Los resultados experimentales obtenidos para cada una de las pulpas se reportan en la Tabla C-2.

La cantidad de ácidos orgánicos encontrados en la mezcla se encuentra en el intervalo esperado, considerando que la mezcla es producto de la combinación de las otras dos. Se consultaron algunas fuentes bibliográficas con el fin de establecer la concordancia con los resultados obtenidos, los resultados se presentan en Tabla C-3.

De acuerdo con los resultados reportados en las Tabla C-2 y la Tabla C-3, el contenido de ácidos orgánicos en la pulpa de remolacha presenta una gran variabilidad que depende de diversos factores: de la especie o variedad específica del fruto (origen botánico), del método de cultivo, del

origen geográfico, del grado de madurez y de los métodos de conservación empleados (en especial los tratamientos térmicos, que pueden degradar algunos compuestos, por ejemplo, la vitamina C que es muy termo lábil).

Tabla C-2. Contenido de ácidos orgánicos identificados en las pulpas rojas.

Ácido Orgánico	Contenido (% p/p)		
	Remolacha	Guayaba	Mezcla
Oxálico	0,007	0,015	0,008
Cítrico	0,014	0,102	0,037
Málico	0,030	----	0,009
Ascórbico	----	0,004	0,002
Succínico	0,021	0,143	0,110

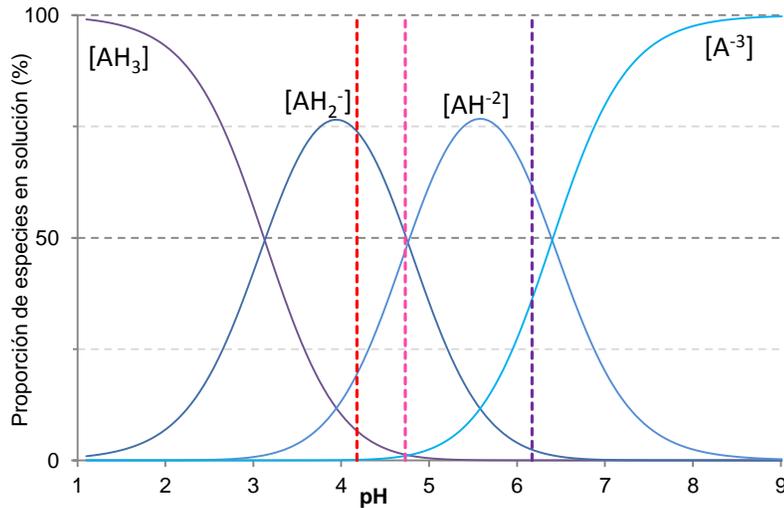
Una situación similar se observa en los resultados de la caracterización de la guayaba. Se ha encontrado una gran variación en la composición de los carbohidratos y ácidos orgánicos con la variedad cultivada, con las condiciones de almacenamiento (por ejemplo, el empleo de lactato de calcio) y con el grado de madurez. (Charles *et al.*, 2006; Soares *et al.*, 2007; Bavec *et al.*, 2010; Wruss *et al.*, 2015; Javed *et al.*, 2016; Vasconcellos *et al.*, 2016).

Tabla C-3. Contenido de ácidos orgánicos en remolacha y guayaba.

Fruta o Vegetal	Ácido cítrico	Ácido málico	Ácido ascórbico	Otros ácidos orgánicos	Referencia
Remolacha	304,44 ± 62,16 (mg/kg)	1,63 ± 0,07 (g/kg)	----	Siquímico: 25,03 ± 8,19 (g/kg)	(Bavec <i>et al.</i> , 2010)
	0,030%	0,163%	----	2,503%	
	----	----	----	Oxálico: 525 ± 65,4 (mg/L)	(Wruss <i>et al.</i> , 2015)
				0,053%	
	3,67 ± 0,09 (mg/g)	8,57 ± 0,15 (mg/g)	1,68 ± 0,11 (mg/g)	----	(Vasconcellos <i>et al.</i> , 2016)
	0,034%	0,080%	0,016%		
Guayaba	374 (mg/100g)	106 (mg/100g)	178 (mg/100g)	Tartárico: 0,787 (mg/100g)	(Javed <i>et al.</i> , 2016)
	0,374%	0,106%	0,178%	0,001%	
	0,73%	0,23%	0,40%	Glicólico: 0,10%	(Charles <i>et al.</i> , 2006)
	----	----	168,36 (mg/100g)	----	(Soares <i>et al.</i> , 2007)
		0,168%			

Además de estos factores de variación, es importante considerar la naturaleza química de los ácidos identificados, sus disociaciones y los posibles equilibrios que presentan, en especial debido a su reconocida acción antimicrobiana. Para ello se consideraron el pH de las pulpas y las constantes de disociación de los principales ácidos identificados, en este caso los ácidos cítrico, málico y succínico.

La representación de la concentración de cada una de las especies en función del pH de la Figura C-10 permite identificar las especies predominantes en solución del ácido cítrico a diferentes pH. Sin embargo, no es posible corroborar experimentalmente esta información con las técnicas aplicadas para el presente proyecto. En la Figura C-11 se presentan los esquemas para la disociación de los ácidos málico y succínico, que se encuentran presentes en todas las pulpas.



pH guayaba (---), *pH mezcla* (---), *pH remolacha* (---).

Figura C-10 Esquema de la disociación del ácido cítrico.

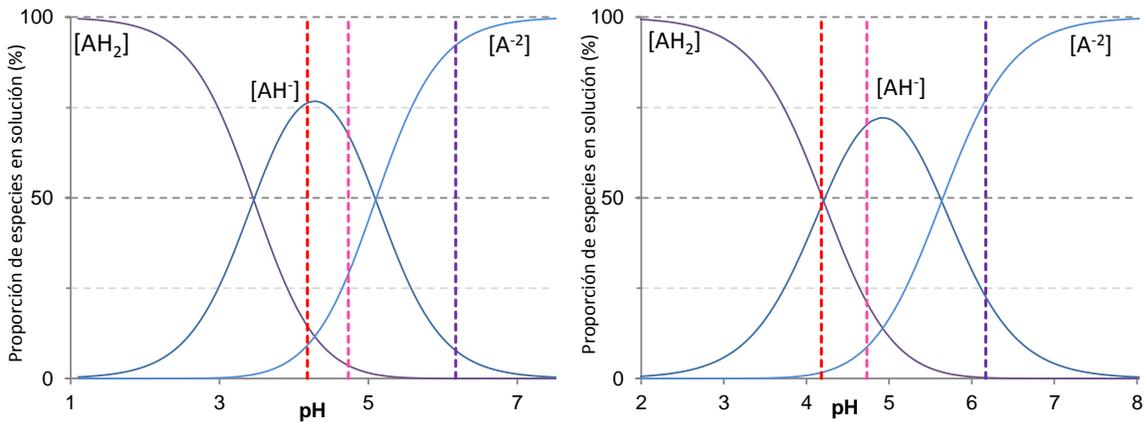


Figura C-11. Esquema de la disociación de los ácidos málico (A) y succínico (B).

Cuando el pH de la pulpa es mayor el equilibrio de los ácidos orgánicos (en este caso el ácido cítrico) se desplaza hacia la derecha, por lo que el grado de disociación aumenta y su comportamiento es similar al de los ácidos fuertes. En el caso de la pulpa de guayaba, dado que el pH es inferior, el grado de disociación es menor y se pueden encontrar tres especies en solución. El pH de la mezcla coincide con el pK_{a2} , por lo que en esta pulpa se encontrarán dos especies del ácido en una misma proporción.

El mismo análisis puede hacerse para los ácidos málico y succínico (Figura C-11), que son dipróticos. Para la pulpa de remolacha se observan dos especies en solución, donde la más abundante es la más disociada (75%). Para las pulpas de guayaba y para la mezcla se presentan tres especies diferentes en solución, donde la más abundante es la parcialmente disociada, $[AH^-]$. Al tener mayor cantidad de especies no disociadas los microorganismos serán más sensibles al medio, por lo que tendrán mayor probabilidad para mantenerse y multiplicarse en la mezcla y en la pulpa de remolacha, respectivamente.

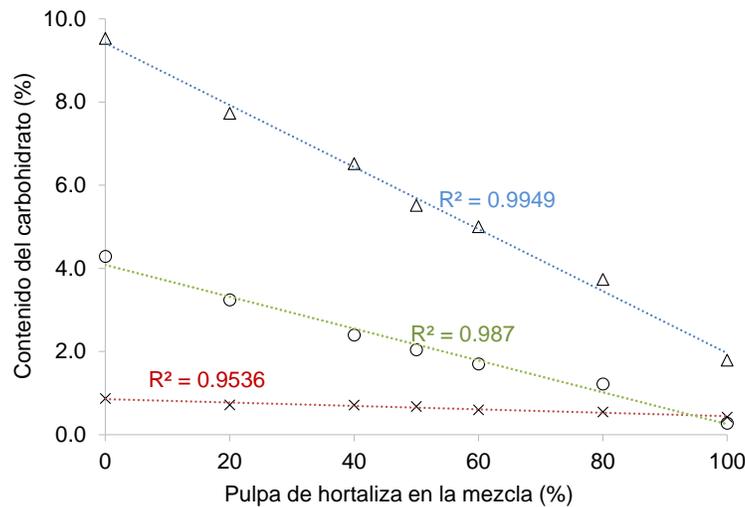
Caracterización de pulpas amarillas

Para la obtención de las mezclas de pulpas amarillas se emplearon pulpas de zanahoria o ahuyama en combinación con una pulpa de fruta: uchuva, maracuyá o mango, en diferentes proporciones. Los resultados de la caracterización se presentaron anteriormente.

Caracterización de carbohidratos

Se realizó la caracterización del contenido de carbohidratos (sacarosa, glucosa y fructosa) para las pulpas de mango, ahuyama y las mezclas obtenidas a partir de estas dos pulpas en diferentes proporciones. Para las cuantificaciones se emplearon las rectas de calibración y los tiempos de retención presentados en el ANEXO B. Los resultados se presentan en la Figura C-20.

Se observa una tendencia lineal para los tres carbohidratos cuantificados con una pendiente negativa, ya que el contenido presente en la pulpa de mango es mayor que en la ahuyama. Sin embargo, la tendencia para la glucosa es prácticamente horizontal, debido a que su contenido es similar en el mango y la ahuyama, por lo que, al aumentar la proporción de ahuyama en la mezcla el contenido de glucosa permanece prácticamente constante.



Sacarosa (Δ), Fructosa (\circ), Glucosa (\times).

Figura C-20. Determinación del contenido de carbohidratos en la mezcla de mango y ahuyama.

Para todas las mezclas evaluadas el contenido de sacarosa es mayor que el encontrado para glucosa y fructosa. Considerando que en todos los casos el comportamiento para los tres

carbohidratos es lineal, puede decirse que no se presenta hidrólisis de la sacarosa, por lo que se mantiene el equilibrio de los carbohidratos antes y después de realizar la mezcla.

Se espera que las bacterias ácido lácticas crezcan y se mantengan viables en las pulpas con un alto contenido de glucosa y sacarosa, por tratarse de fuentes de carbono que pueden metabolizarse más fácilmente, por lo que, la pulpa de mango y de ahuyama se consideran un buen sustrato para la fermentación láctica.

Caracterización de ácidos orgánicos

Se realizó la caracterización de los ácidos orgánicos presentes en la pulpa de mango, ahuyama y en la mezcla seleccionada para la etapa de fermentación (80% mango y 20% ahuyama). Para el análisis se emplearon los resultados presentados previamente en el ANEXO B. La evaluación experimental del contenido de ácidos orgánicos en las diferentes pulpas (ahuyama, mango y mezcla) se muestran en la Tabla C-5, mientras que la Tabla C-6 reúne algunas fuentes bibliográficas consultadas para comparar los resultados obtenidos experimentalmente para las pulpas de ahuyama y mango.

Tabla C-5. Cuantificación de ácidos orgánicos identificados en las pulpas amarillas.

Ácido Orgánico	Contenido (% p/p)		
	Ahuyama	Mango	Mezcla
Oxálico	0,006	0,006	0,005
Cítrico	0,014	0,018	0,023
Málico	0,017	0,013	0,009
Tartárico	----	0,007	0,007
Succínico	0,006	1,191	0,953

Se observa que a pesar de tratarse de la misma especie de ahuyama (*Cucurbita maxima*) los valores para los ácidos orgánicos varían de manera importante dependiendo de la variedad cultivada, la madurez del fruto, del tiempo y condiciones de almacenamiento y del procesamiento. Los ácidos orgánicos encontrados para el mango también varían con el cultivo y con el estado de maduración. Debido a que se trata de un fruto climatérico, la dinámica del contenido de ácidos orgánicos y carbohidratos presentes en el fruto ha sido objeto de diversos estudios, encontrando una alta dependencia de las condiciones de almacenamiento (temperatura, tiempo, atmósfera), con la dinámica de las enzimas presentes en el fruto y con el aumento en el contenido de carbohidratos (sacarosa, glucosa y fructosa) y ácidos orgánicos (en especial el ácido cítrico y málico). (Medlicott, A.P. and Thompson, 1985; Galvis *et al.*, 2002; Hossain *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2015)

El contenido de ácido succínico es superior al encontrado para el cítrico y el málico, lo cual puede deberse al alto estado de madurez de los frutos utilizados, el método de cultivo (suplementos en los suelos, control de plagas, etc.) y condiciones de almacenamiento poscosecha. Estas últimas pueden ocasionar modificaciones en la actividad enzimática de los frutos, las que a su vez cambian las características fisicoquímicas de la pulpa obtenida luego del procesamiento. Otros aspectos que pueden modificar el contenido de los ácidos orgánicos en los frutos están relacionados con las fumigaciones y los productos empleados en el momento de la producción. (Cruz *et al.*, 2012; Khan *et al.*, 2016; Razzaq *et al.*, 2016)

Tabla C-6. Contenido de ácidos orgánicos en ahuyama y mango.

Fruta o Vegetal	Ácido oxálico	Ácido cítrico	Ácido málico	Otros ácidos orgánicos	Referencia
Ahuyama	----	2,01 ± 0,07 (g/kg) 0,201%	4,31 ± 0,00 (g/kg) 0,431%	Fumárico 0,39 ± 0,09 (g/kg)	(Nawirska-Olszańska <i>et al.</i> , 2014)
	----			Ascórbico 1,68 ± 0,11 (mg/100g) 124,2 ± 13,3 (mg/kg)	(Zhou <i>et al.</i> , 2017; Kopta <i>et al.</i> , 2018)
	554,13 (mg/100g) 0,033%	891,7 (mg/100g) 0,054%	----	Succínico 3,94 (mg/100g) Fumárico 6,84 (mg/100g) Ascórbico 1827,59 (mg/100g) Tartárico: 1542,56 (mg/100g)	(Priecina and Karklina, 2015) ¹⁰
Mango	----	353,2 (mg/100g) 0,353%	78,3 (mg/100g) 0,078%	Succínico 4,3 (mg/100g)	(Askar <i>et al.</i> , 1982)
	----	0,5%	0,1%	Succínico 0,4%	(Galvis <i>et al.</i> , 2002)
	7,29 ± 0,3 (mg/100g) 0,007%	626,16 ± 0,5 (mg/100g) 0,626%	168,20 ± 0,5 (mg/100g) 0,168%	Ascórbico 35,33 ± 0,5 (mg/100g) Quínico 52,44 ± 0,7(mg/100g)	(Cano <i>et al.</i> , 1994)

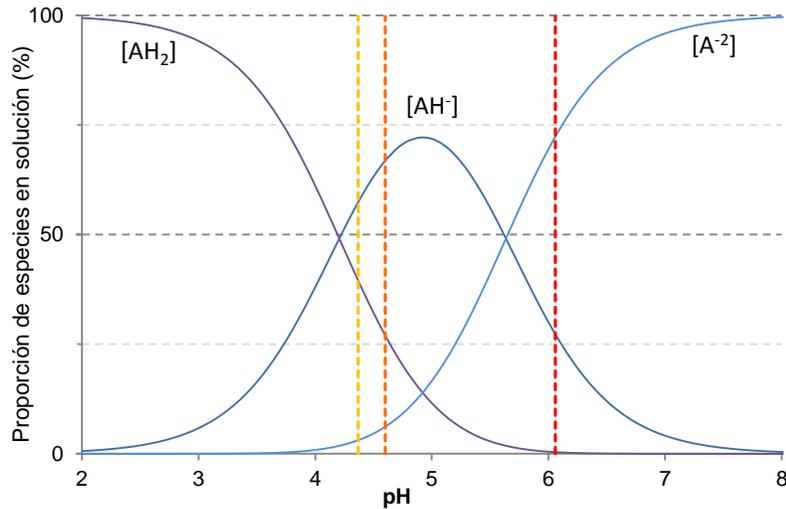
Para la mezcla de mango (80%) y ahuyama (20%) el ácido presente en una mayor proporción es el succínico, seguido por el cítrico y el málico. Respecto a la proporción de los ácidos encontrados en la mezcla y su relación con el contenido en las pulpas puras, el contenido de ácido cítrico es mayor que el encontrado en la pulpa de mango y en la de ahuyama, mientras que para el ácido málico el contenido es inferior que el de las pulpas sin mezclar. Estas variaciones pueden considerarse como frecuentes, ya que la mezcla se obtiene a partir de pulpas cuyo contenido varía ampliamente, tal como se discutió previamente.

Teniendo en cuenta los principales ácidos orgánicos encontrados en las pulpas amarillas se consideró el efecto de su disociación, tal como se detalló en la Tabla 1-2. La Figura C-21 y la Figura C-22 muestran los esquemas para la disociación del ácido succínico, cítrico y málico, respectivamente. Considerando que la mezcla tiene una alta proporción de pulpa de mango (80%), es de esperar que su valor de pH sea muy cercano.

Adicionalmente, la cantidad de ácido succínico es alta en relación con los otros ácidos presentes en las pulpas, especialmente en el mango y la mezcla, por lo que será el que más influya en las bacterias que se inocularán posteriormente. Por tratarse de un ácido diprótico puede verse que en la pulpa de ahuyama se encuentran dos especies, y la de mayor cantidad es la que está completamente disociada, $[A^{-2}]$. En la pulpa de mango y en la mezcla se encuentran tres especies,

¹⁰ Unidades de los resultados expresadas como: mg/100g de materia seca. Identifica y cuantifica otros ácidos orgánicos.

y la de mayor proporción es la que se encuentra parcialmente disociada $[AH^-]$, para las otras el contenido es bajo (menor del 50 y 10%). Considerando que al tener mayor grado de disociación en los ácidos en solución su comportamiento será similar al de un ácido fuerte, las bacterias inoculadas tendrán un mayor potencial para mantenerse y crecer en las pulpas de ahuyama, mezcla y mango respectivamente.



pH mango (---), *pH mezcla* (---), *pH ahuyama* (---).

Figura C-21. Esquema de la disociación del ácido succínico.

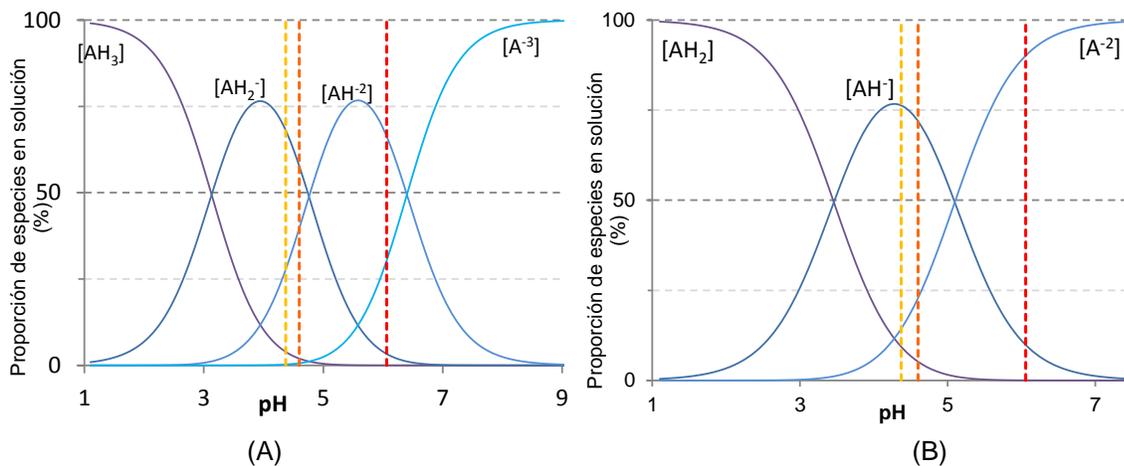


Figura C-22. Esquema de la disociación de los ácidos cítrico (A) y málico (B).

Caracterización de pulpas verdes

Las pulpas verdes se obtuvieron a partir de la mezcla de pulpas de espinaca o guatila con una pulpa de fruta (lulo o feijoa), en diferentes proporciones de acuerdo con el detalle especificado anteriormente. Los resultados de la caracterización de las pulpas antes de la mezcla se presentaron previamente.

Caracterización del color de las mezclas

Se realizó la determinación instrumental de color para las mezclas obtenidas a partir de espinaca con feijoa o lulo. Durante el ensayo experimental se observó un cambio considerable en el color de las mezclas, pasando de verde a marrón. Con el fin de ilustrar este cambio se presenta la Figura C-23, en donde pueden verse dos mezclas de feijoa (50%) – espinaca (50%). El envase de la izquierda de la fotografía contiene la mezcla obtenida en el momento, mientras que en el de la derecha han pasado 3h.



Figura C-23. Variación de color para pulpas de feijoa y espinaca de acuerdo con el tiempo de mezclado. Izquierda (t = 0h), derecha (t = 3h).

Debido a esta diferencia, la caracterización instrumental de color se realizó en dos momentos (t = 0h y t = 3h), con el fin de evaluar si se presentan o no cambios relevantes en las coordenadas L^* , a^* , b^* . Los resultados se presentan en la Figura C-24. Se evidencia que la principal diferencia, luego de diferentes tiempos de mezcla, se presenta para la coordenada a^* , que va del rojo al verde, tanto en las mezclas con pulpa de feijoa como con lulo.

En general, se observan tendencias lineales inversamente proporcionales a la cantidad de espinaca en la mezcla, para la luminosidad (L^*) y para la coordenada b^* , en especial si se

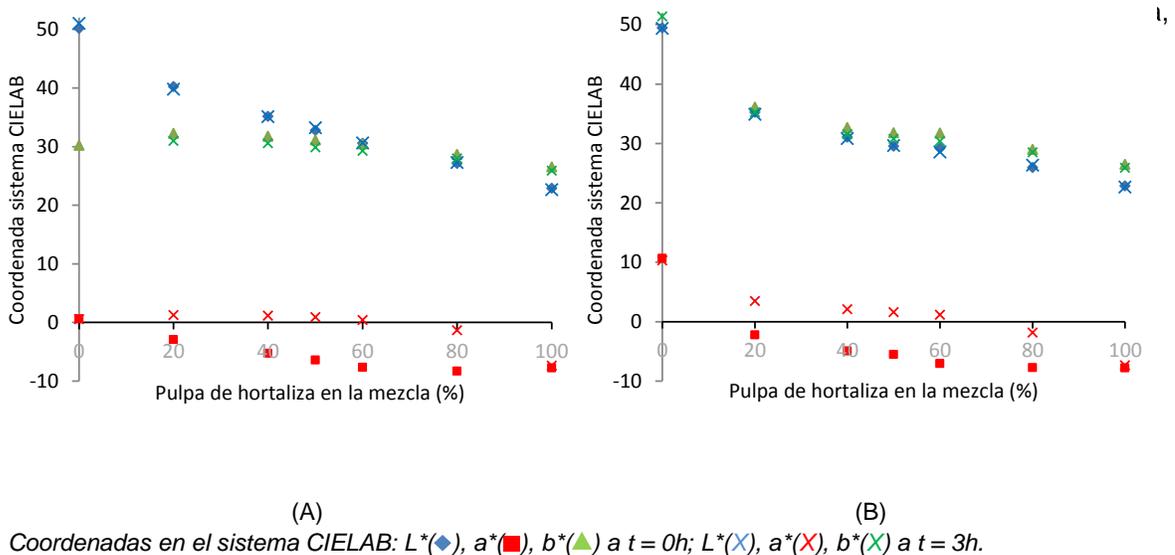
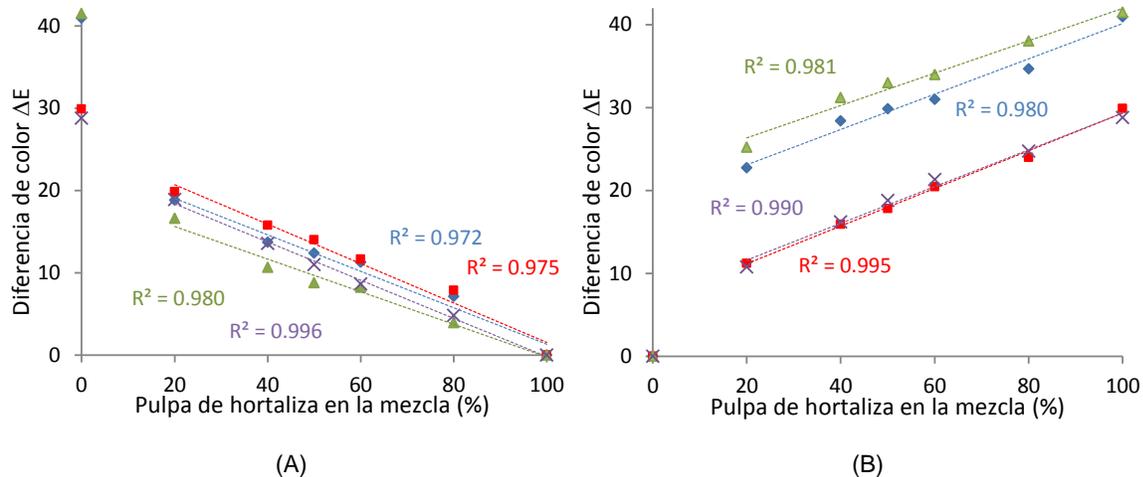


Figura C-24. Caracterización instrumental de color en las mezclas de pulpas de feijoa (A) y lulo (B) con espinaca en diferentes tiempos.

Por lo tanto, ya que no hay diferencias para b^* (azul – amarillo) ni para la luminosidad (L^*), se concluye que la adición de la fruta (feijoa o lulo) afecta a los compuestos responsables del color verde en la espinaca. Por esta razón, al cabo de un tiempo de realizar la mezcla, la pulpa pasa de color verde a marrón (tonos menos verdes y más rojos) lo que puede afectar la aceptabilidad de esta pulpa.

Se calcularon las diferencias absolutas de color entre las muestras considerando los cambios presentados. Los resultados se muestran en la Figura C-25.



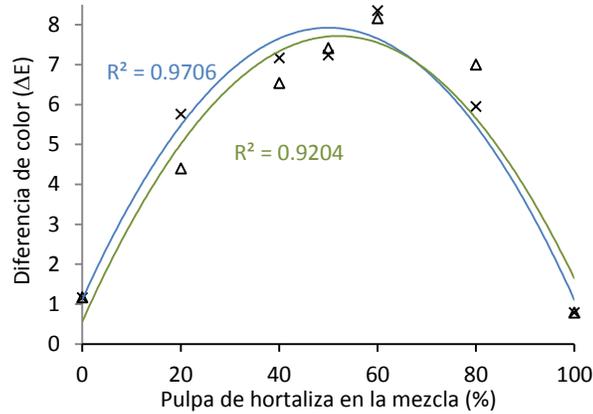
Mezclas con: lulo a $t = 0h$ (\blacktriangle) y $t = 3h$ (\blacklozenge); feijoa a $t = 0h$ (\times) y $t = 3h$ (\blacksquare).

Figura C-25 Diferencias de color en las mezclas de fruta (feijoa o lulo) y espinaca en relación con la pulpa de espinaca (A) y en relación con la pulpa de fruta (B).

Al tomar como referencia la pulpa de espinaca (A), se observan tendencias lineales proporcionales a la cantidad de espinaca en las mezclas, con pendientes negativas. Las diferencias son mayores para las mezclas con feijoa que con lulo y aumentan cuando el tiempo de la mezcla es mayor, a pesar de que al comparar las pulpas de frutas (puras) el comportamiento es opuesto; es decir, la diferencia de color con la pulpa de lulo es mayor que con feijoa.

Si se tiene como referencia el color de la pulpa de fruta (B) también se observan tendencias lineales con pendientes positivas proporcionales con la cantidad de espinaca en la mezcla. Las diferencias son mayores en las pulpas con lulo y aumentan cuando la pulpa es fresca. Para las diferencias de color en las pulpas con feijoa no se presentan cambios importantes si la mezcla es fresca o no.

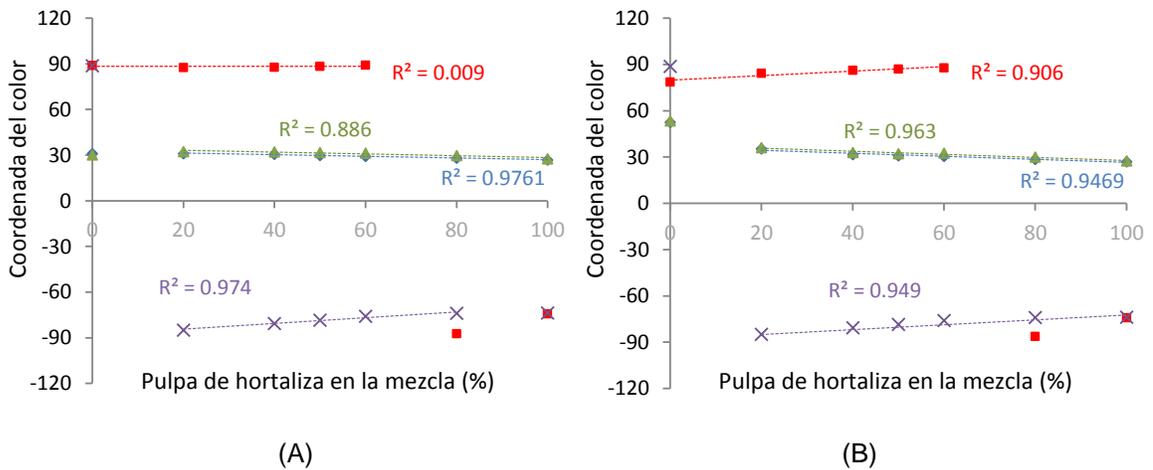
Con el fin de comparar las diferencias absolutas de color debidas únicamente al tiempo de mezcla se presenta la Figura C-26. Se observan pequeñas diferencias para las pulpas puras (feijoa, lulo y espinaca, 0% y 100%, respectivamente), donde los valores son cercanos a 1. Sin embargo al realizar la mezcla las diferencias aumentan hasta un máximo cercano a 8 en la mezcla con 60% de pulpa de espinaca.



Mezcla de pulpas de feijoa (x) y de lulo (Δ) con pulpa de espinaca.

Figura C-26. Diferencia de color para las mezclas de pulpas de feijoa y lulo con espinaca

Se realizó la transformación de las coordenadas a coordenadas radiales para evaluar la cromaticidad de las mezclas los resultados se presentan en la Figura C-28. En general, no se observan diferencias relevantes al comparar las mezclas obtenidas a partir de feijoa (A) o lulo (B) las únicas diferencias se presentan en las pulpas de frutas sin mezcla (0%). Se presentan tendencias lineales para todos los atributos, proporcionales a la cantidad de hortaliza en la mezcla.



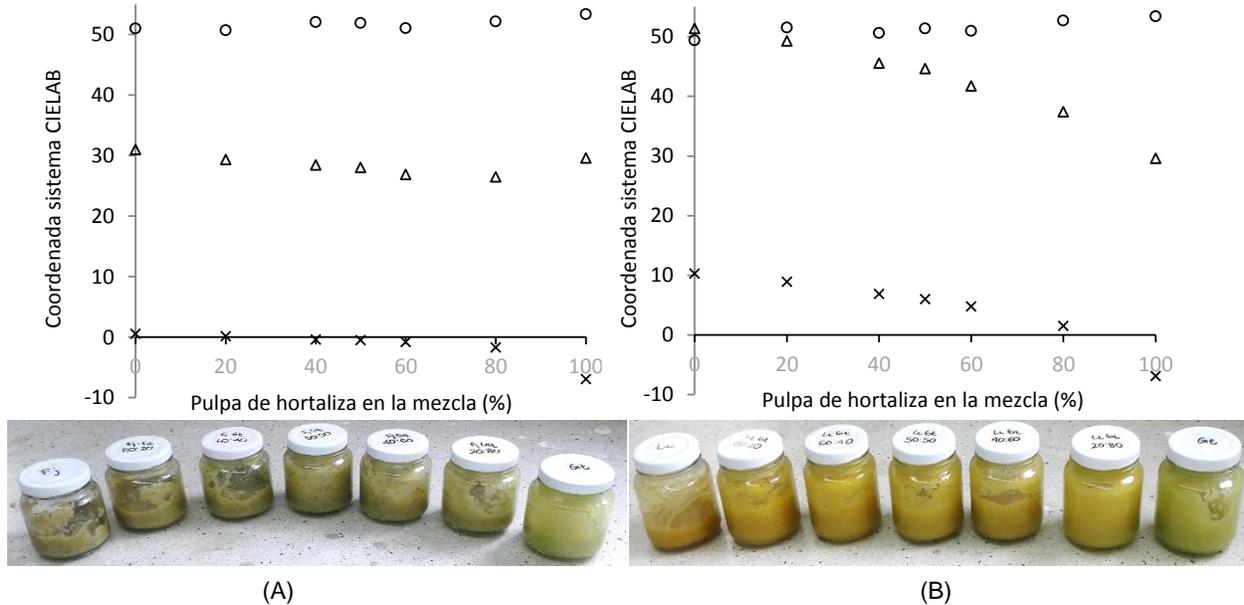
C* a t = 0h (▲) y t = 3h (◆); h a t = 0h (x) y t = 3h (■).

Figura C-28. Propiedades del color de mezclas de pulpas de feijoa (A) o lulo (B) con espinaca.

En el caso de la saturación (C*) no se observa una diferencia si la mezcla ha sido obtenida en diferentes tiempos y las pendientes, aunque negativas, son muy pequeñas, por lo que el cambio percibido es pequeño. Para la tonalidad o matiz (h) se observan pendientes positivas y se observan cambios importantes con el tiempo: se tienen valores negativos las mezclas obtenidas en el momento, que pasan a ser positivos luego de 3 horas de realizada la mezcla. Se resalta una excepción a este comportamiento para la mezcla con 80% de pulpa de espinaca, cuyo valor permanece negativo después de las 3 horas, debido a que el valor de a* también es negativo. Los

valores para la tonalidad de las frutas (feijoa y lulo) son positivos, mientras que para la espinaca son negativos y permanecen muy cercanos antes y después de las 3 horas.

Por otra parte también se evaluó la obtención de mezclas de feijoa o lulo con guatila como hortaliza. La Figura C-29 muestra los resultados obtenidos. No se realizaron determinaciones de color para diferentes tiempos luego del mezclado considerando que no se observaron cambios notables en el color de las pulpas luego de realizar el mezclado.



Coordenadas en el sistema CIELAB: $L^*(o)$, $a^*(x)$, $b^*(\Delta)$

Figura C-29. Caracterización instrumental de color en mezclas de pulpas de feijoa y lulo con guatila

Debido a que las pulpas de feijoa y guatila tienen colores similares, la tendencia del comportamiento del color para las tres coordenadas en la mezclas es lineal, casi horizontal. En el caso de la mezcla empleando pulpa de lulo se observa tendencias lineales proporcionales a la cantidad de guatila adicionada: la luminosidad (L^*) tiene una pendiente positiva muy pequeña, de manera que permanece casi constante, mientras que las coordenadas a^* y b^* disminuyen al aumentar la proporción de guatila, en la mezcla; es decir, se observan tonos más rojos y amarillos y menos verdes y azules a medida que la mezcla tiene una proporción mayor de guatila.

Con el fin de confirmar las variaciones en el color tomando como referencia las pulpas de fruta (feijoa o lulo) y la guatila, se calcularon las diferencias absolutas y las coordenadas radiales, cuyos resultados se muestran en la Figura C-30.

Para las diferencias de color (A) se observan tendencias lineales en todos los casos, con pendientes negativas cuando se toma como referencia la guatila y positivas cuando la referencia es la fruta (lulo o feijoa). Se perciben mayores valores (y con una pendiente más acentuada) para las mezclas con lulo que con feijoa, incluso, las diferencias entre las mezclas y la guatila son casi constantes a medida que se adiciona la guatila. Por lo tanto, y considerando que la tendencia lineal puede ampliarse hasta las diferencias para las pulpas de frutas (0%), se puede decir que en este caso la pulpa de fruta influye más sobre el color de la mezcla que la pulpa de hortaliza.

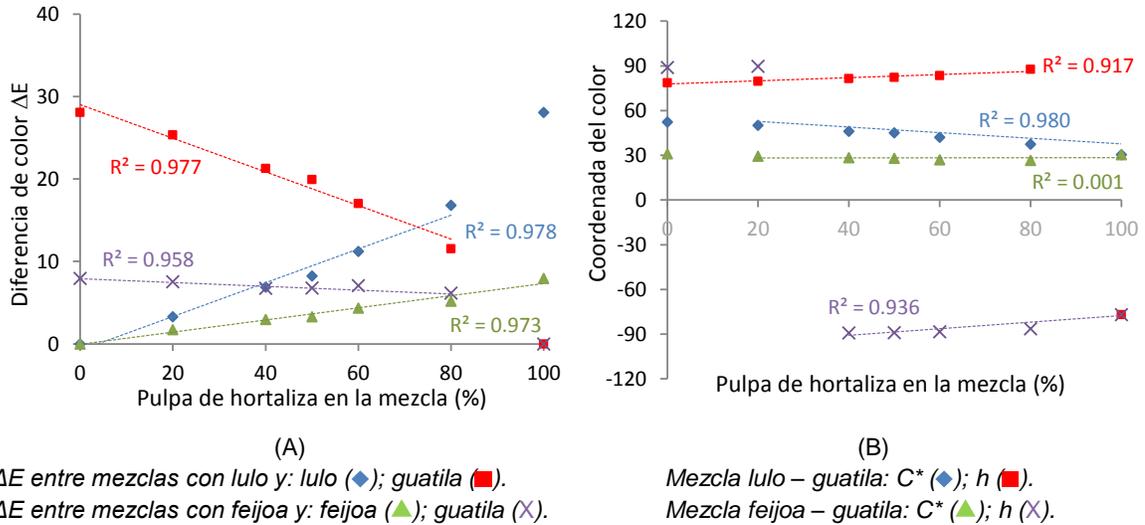
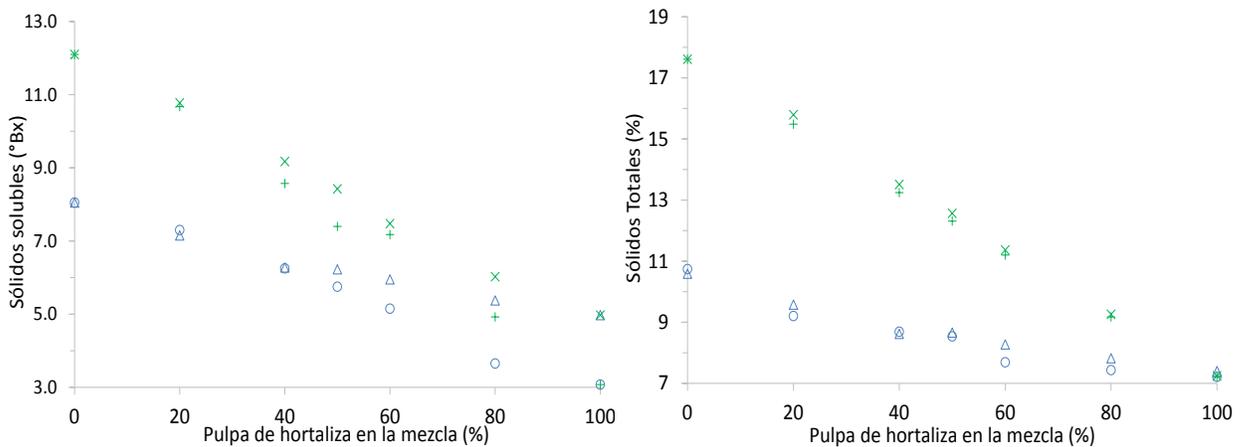


Figura C-30 (A) Diferencias de color en las mezclas de guatila en relación con la pulpa de fruta (feijoa o lulo) o de hortaliza. (B) Propiedades del color en las mezclas de guatila.

Para la evaluación de la cromaticidad (B) se puede ver que la variación de las propiedades, tanto saturación (C^*) como tonalidad (h), es muy pequeña con la adición de la pulpa de guatila, sin embargo tienden a la linealidad con pendientes positivas para la tonalidad y negativas para la saturación. Cabe resaltar que la tonalidad para la pulpa de feijoa y para la mezcla con el 20% de guatila es positiva, mientras que para las otras mezclas y la guatila incluida, es negativa. Esto se debe a que los valores de la coordenada a^* son negativos, lo que indica que la tonalidad verde en estas pulpas es mayor en comparación con las otras.

Caracterización de sólidos solubles y totales de las mezclas

En la Figura C-32 se presentan los resultados de la caracterización de sólidos solubles y totales para las pulpas verdes.



Mezclas: Lulo – Espinaca (\circ), Lulo - Guatila (Δ), Feijoa - Guatila (\times), Feijoa – Espinaca ($+$).

Figura C-32. Caracterización de sólidos solubles (A) y sólidos totales (B) de mezclas de pulpas verdes.

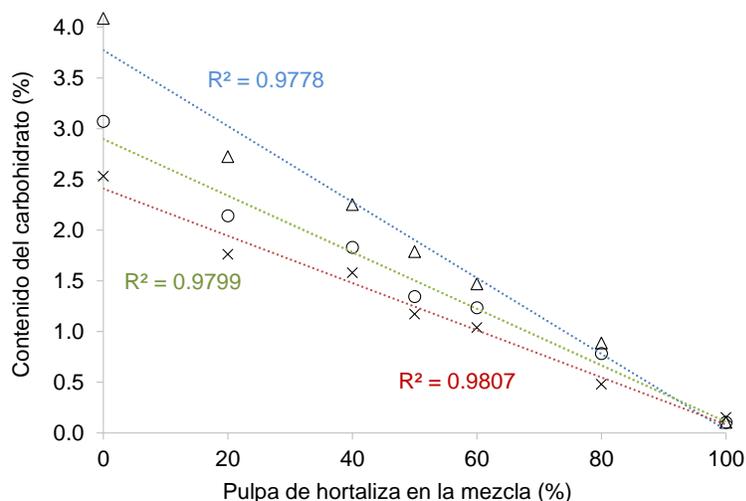
Para los sólidos solubles se observan tendencias lineales con pendientes negativas para todas las mezclas. Si el porcentaje de la pulpa de hortaliza es menor del 50% la fruta influye mayoritariamente en la cantidad de sólidos solubles de la mezcla, sin embargo, cuando el porcentaje de la hortaliza es superior es ésta la que determina los sólidos solubles en la mezcla; es decir, antes del 50% no se observa una diferencia relevante si se emplea espinaca o guatila y cuando el porcentaje de hortaliza en la mezcla aumenta no se evidencia una diferencia al emplear pulpa de feijoa o de lulo en la mezcla.

Al observar los resultados para los sólidos totales el comportamiento no es el mismo, la diferencia observada al emplear diferentes hortalizas ya no se presenta; es decir, los sólidos totales en las pulpas verdes dependen de la fruta empleada (feijoa o lulo). Por lo tanto, se pueden ver valores de sólidos totales mayores para las mezclas con feijoa que para las mezclas con lulo. Sin embargo, se siguen evidenciando tendencias lineales con pendientes negativas, tal como ocurre en los sólidos solubles.

Caracterización de carbohidratos

Posteriormente se realizó la cuantificación de carbohidratos (sacarosa, glucosa y fructosa) para las pulpas de feijoa, espinaca y las mezclas obtenidas a partir de estas dos pulpas en diferentes proporciones. Para ello se emplearon los resultados presentados previamente en el ANEXO B.

Los resultados experimentales se presentan en la Figura C-33. Se observan tendencias lineales, con pendientes negativas, debido a que el contenido de todos los carbohidratos es mayor en la feijoa que en la espinaca.



Sacarosa (Δ), Fructosa (o), Glucosa (x).

Figura C-33. Determinación del contenido de carbohidratos en la mezcla de feijoa y espinaca.

En la pulpa de feijoa el contenido de sacarosa es mayor, seguido por la fructosa y la glucosa. Este comportamiento se mantiene para todas las mezclas. En el caso de la pulpa de espinaca el contenido de los tres carbohidratos es muy bajo y similar entre sí (alrededor de 0,1%). Con estos resultados no se evidencia una hidrólisis de la sacarosa presente en las mezclas, ya que el contenido es proporcional a la cantidad de espinaca presente en la pulpa.

Caracterización de ácidos orgánicos

Se determinaron los ácidos orgánicos presentes en las pulpas de feijoa, espinaca y en la mezcla seleccionada (40% de pulpa de feijoa y 60% de pulpa de espinaca). Para la detección y cuantificación de los ácidos se emplearon los resultados reportados previamente. Los resultados de los ensayos experimentales se muestran en la Tabla C-8. La Tabla C-9 permite realizar una comparación de los resultados obtenidos con algunas fuentes bibliográficas previas.

Tabla C-8. Cuantificación de ácidos orgánicos identificados en las pulpas verdes

Ácido Orgánico	Contenido (% p/p)		
	Espinaca	Feijoa	Mezcla
Oxálico	0,105%	0,059%	0,203%
Cítrico	0,004%	0,625%	0,310%
Málico	Málico	0,374%	0,049%
Succínico	Succínico	0,313%	0,213%
Otros ácidos encontrados	Malónico Acético Propiónico	Malónico Acético	Tartárico 0,177%

Tabla C-9. Contenido de ácidos orgánicos en espinaca y feijoa.

Fruta o Vegetal	Ácido oxálico	Ácido cítrico	Ácido málico	Otros ácidos orgánicos	Referencia
Espinaca	704,4 (µeq/g)	50,0 (µeq/g)	76,6 (µeq/g)	Acético: 16,1 (µeq/g) Fórmico: 19,2 (µeq/g) Fumárico: 27,8 (µeq/g) Láctico: 9,0 (µeq/g) Succínico: 20,7 (µeq/g)	(Lin <i>et al.</i> , 1971) ¹¹
	6700 (mg/kg)	400 (mg/kg)		Pirúvico Succínico Fumárico	(Wang <i>et al.</i> , 2009)
	0,670%	0,040%			
	900 (µg/g)	----	-----	Ascórbico: 25,75 ± 6,12 (mg/100g)	(Koh <i>et al.</i> , 2012)
	385,9 (mg/100g)	12,0 (mg/100g)	13,0 (mg/100g)	----	(Askar <i>et al.</i> , 1982)
	0,386%	0,012			
Feijoa	----	1430,6 – 1607,0 (mg/100g)	104,3 – 172,3 (mg/100g)	Ascórbico (Vit. C): 16,0 – 16,4 (mg/100g)	(Rodríguez <i>et al.</i> , 1992)
	----	2,0%	1,0%	Quínico : 0,5%	(Harman, 1987)
	0,39 ± 0,12 (g/kg)	13,65 ± 1,56 (g/kg)	0,55 ± 0,18 (g/kg)	----	(Castellanos <i>et al.</i> , 2016)
	0,039%	1,365%	0,055%		

El principal ácido orgánico encontrado en la espinaca es el ácido oxálico (90%). Se prefieren las variedades de espinaca que poseen menor contenido de ácido oxálico porque su consumo se

¹¹ Unidades de los resultados expresadas en base seca.

asocia con la formación de cálculos en los riñones. Sin embargo, al igual que las otras hortalizas su composición varía considerablemente con la variedad del cultivo empleado, el método (orgánico o convencional), la radiación, los nutrientes que recibe y las condiciones de procesamiento, entre otros. (Liu *et al.*, 2015; Gent, 2016; Shi *et al.*, 2016; Siener *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016)

En el caso de la feijoa el contenido de ácidos orgánicos la variación presentada en relación con las fuentes bibliográficas consultadas se debe principalmente al procesamiento al que han sido sometidos los frutos y a su grado de madurez.

Tal como en el caso de las pulpas rojas y amarillas, las pulpas verdes son producto de una mezcla muy específica, razón por la cual, no se encuentran reportes en la literatura para realizar la comparación.

Se consideró el efecto de la disociación de los principales ácidos orgánicos encontrados en las pulpas verdes, los cuales se esquematizan en la Figura C-34.

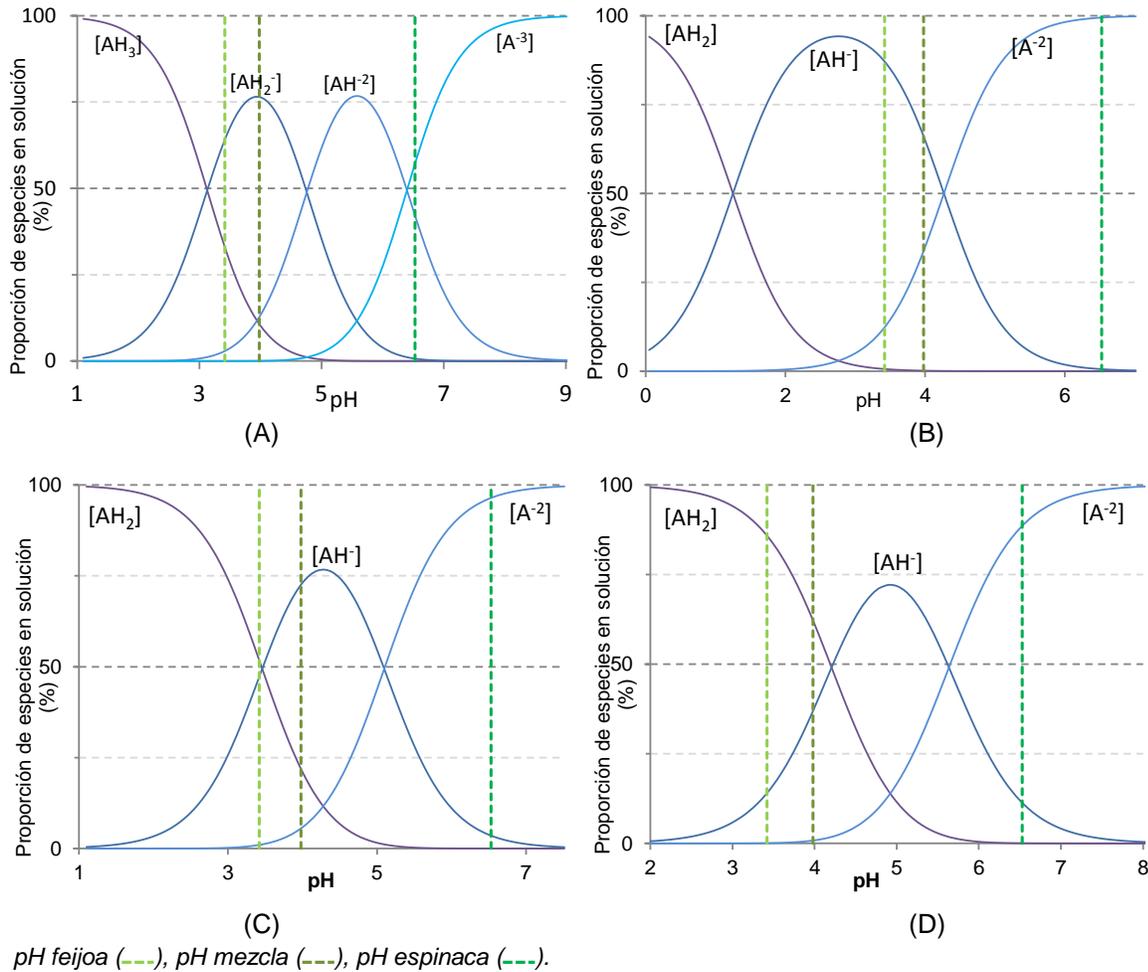


Figura C-34. Esquema de la disociación de los principales ácidos orgánicos en las pulpas verdes. Ácidos: cítrico (A), oxálico (B), succínico (C) y málico (D)

A pesar de que el porcentaje de pulpa de espinaca en la mezcla es del 60%, el valor de la mezcla se encuentra más cercano a la pulpa de feijoa, tal como se discutió previamente. Esto es importante ya que a menores valores de pH la disociación de los ácidos en las pulpas es menor, por lo que su actividad antimicrobiana es superior.

Teniendo en cuenta lo anterior, el comportamiento de la mezcla será similar al de la pulpa de feijoa. Puede verse que para el pH de la feijoa (3,42) se encuentran tres especies del ácido cítrico en solución, dos del oxálico, del succínico y del málico. En cada caso la especie que se encuentra en mayor proporción está presente en diferentes grados de disociación (para el cítrico es la $[AH_2]$, en el oxálico es $[AH]$, en el succínico las dos especies están al 50% porque el pH coincide con el pK_a y en el málico $[AH_2]$), sin embargo, en ningún caso predomina la especie disociada.

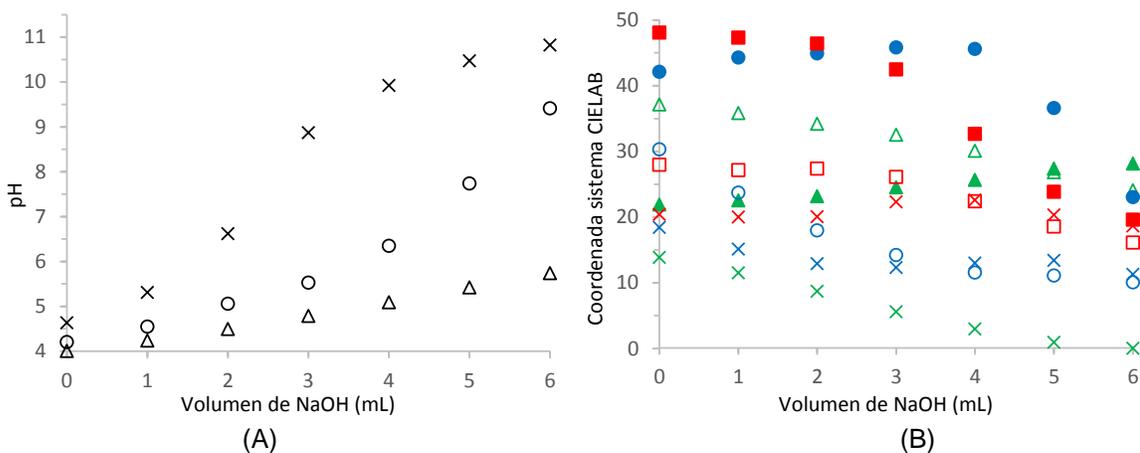
En la pulpa de espinaca el comportamiento es opuesto (solo para el ácido oxálico las especies se encuentran cerca del 50%), ya que en todos los casos la especie en solución predominante es la que se encuentra totalmente disociada, por ello su comportamiento tiende a parecerse al de un ácido fuerte y su acción antimicrobiana es menor. Por lo tanto se espera que al inocular las bacterias lácticas tengan una mayor probabilidad de mantenerse y crecer en la pulpa de espinaca.

ANEXO D. Resultados de la evaluación de operaciones preliminares

Neutralización

- Neutralización de pulpas rojas

En la Figura D-1 se presentan los resultados de la evaluación de la neutralización de las frutas rojas (mora, fresa y guayaba). Inicialmente se consideró la neutralización de las pulpas teniendo como única variable de respuesta el aumento de pH. Sin embargo, el cambio en el color fue evidente, razón por la cual se consideró éste como variable de respuesta. Se detalla el comportamiento de las dos variables (pH en la Figura D-1(A) y color en la Figura D-1(B)), frente a la adición del hidróxido de sodio.



pH: pulpa de mora (Δ); pulpa de fresa (o); pulpa de guayaba (x).

Coordenadas en el sistema CIELAB: Pulpa de mora: L*(▲), a*(Δ), b*(x). Pulpa de fresa: L*(●), a*(o), b*(x). Pulpa de guayaba: L*(■), a*(□), b*(x).

Figura D-1. Comportamiento del pH (A) y de las coordenadas del color (B) en la neutralización de las pulpas rojas.

Al adicionar el hidróxido de sodio se observa un aumento en el pH, el cual tiene un comportamiento diferente para cada pulpa. En el caso de la guayaba, luego de la adición de 2 mL de hidróxido, el pH está por encima de 6, mientras que para la fresa se necesitaron más de 4 mL y la mora alcanzó dicho valor. Considerando que la pulpa de guayaba tiene valores de pH más altos para un mismo volumen de NaOH, puede decirse que se neutraliza con una mayor facilidad.

Se presentan cambios importantes en el color de todas las pulpas con la neutralización. En la mora, la luminosidad (L^*) aumenta proporcionalmente con la adición de hidróxido de sodio, mientras que las coordenadas a^* y b^* disminuyen con una tendencia inversamente proporcional. En el caso de la pulpa de fresa el cambio en las coordenadas del color no es lineal con la neutralización: inicialmente se observa un descenso importante para a^* y b^* y un aumento en L^* (un 8% con respecto al valor inicial) hasta la adición de 4mL. Posteriormente los valores de a^* y b^* se estabilizan y el cambio es menos relevante, mientras que L^* disminuye. En la pulpa de guayaba los cambios de a^* y b^* son menos importantes en comparación con las otras pulpas, pero la luminosidad (L^*) baja de forma notable después de los 2mL de NaOH.

Considerando el cambio en el color con el aumento del pH, pueden verse las diferencias presentes en el proceso de neutralización entre las frutas. Por ejemplo, el pH en la mora pasa de 3,5 a 5,5 al adicionar un 20% v/p de hidróxido (6mL de solución en 30g de pulpa). Sin embargo, la luminosidad (L^*) aumentó cerca del 29% del valor inicial y las coordenadas (a^*) y (b^*) bajaron aproximadamente un 35% y 100%, respectivamente. Para la fresa, se puede decir que el valor de 6,0 en el pH es un “punto de inflexión” para el comportamiento de todas las coordenadas del color.

Los resultados obtenidos para la pulpa de guayaba muestran que con la adición de un 7% (v/p) de la solución de hidróxido (2mL en 30g de muestra) el pH alcanza un valor de 6 sin una variación relevante en las coordenadas de color: la luminosidad (L^*) ha disminuido en 3% respecto al valor inicial, mientras que (a^*) y (b^*) han aumentado en un 2%. Posteriormente, con la adición de 1mL más de hidróxido se tienen los mayores cambios, tanto en el color como en el pH, que llega hasta 8,5 aproximadamente. Dados los resultados obtenidos para esta fruta, se decide adicionar el hidróxido en alícuotas inferiores (0,4 mL en lugar de 1,0mL). Los resultados se muestran en la Figura D-2, en donde se aprecia un aumento de pH proporcional al volumen de NaOH adicionado y pequeñas variaciones para las coordenadas de color.

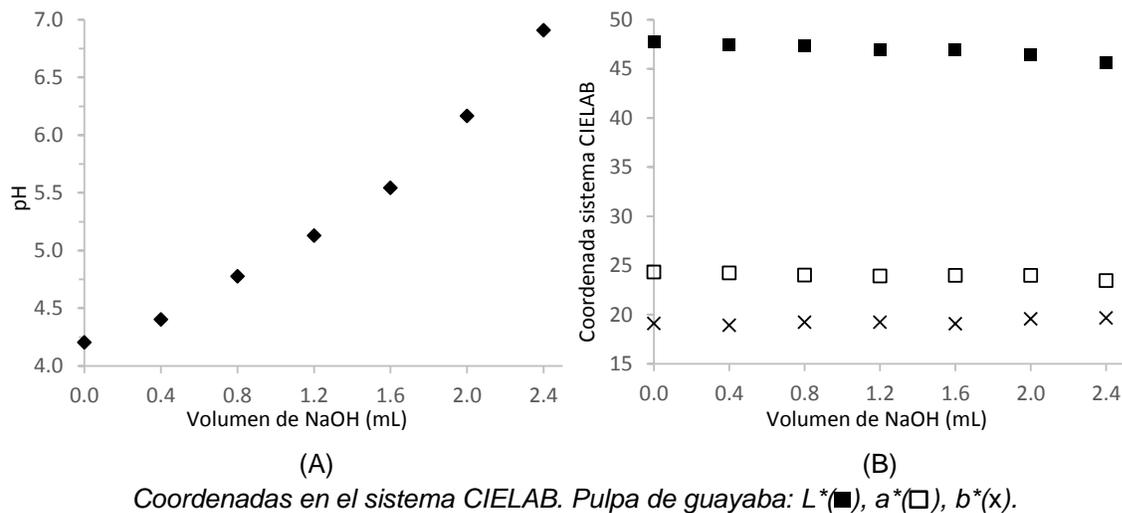


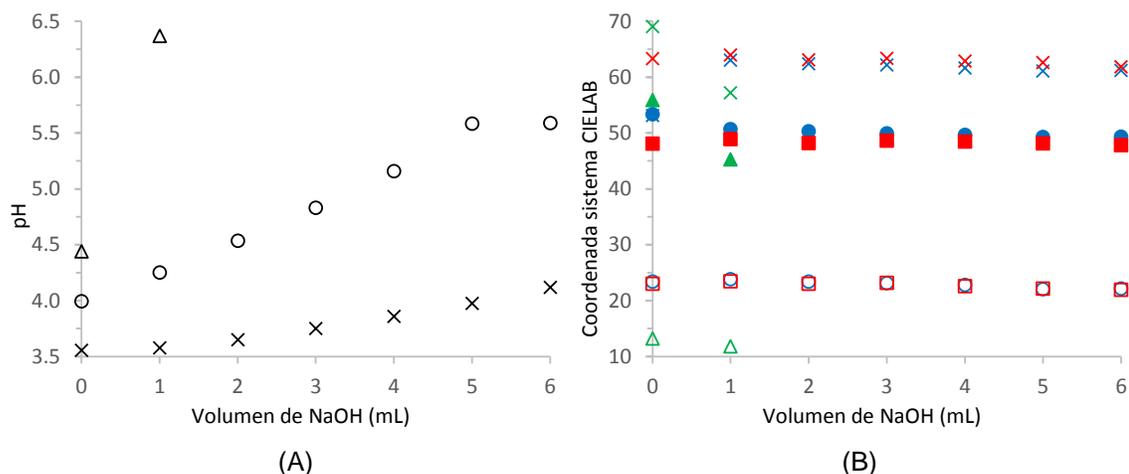
Figura D-2. Comportamiento del pH (A) y de las coordenadas del color (B) en la neutralización de guayaba. Variación del color en función del pH (C).

Las diferencias absolutas obtenidas por el proceso de neutralización de las pulpas, así como los atributos de color, se calcularon mediante las ecuaciones (3.1), (3.2) y (3.3). Los resultados (antes y después de la neutralización) se presentan en la Tabla 6-1.

De acuerdo con estos resultados, las diferencias absolutas del color son significativas para todas las frutas rojas. Tal como se discutió anteriormente los valores para la mora y la fresa son similares (cerca de 20), mientras que para la guayaba la diferencia es sustancialmente menor. Al evaluar el cambio del color en coordenadas radiales (luminosidad L^* , tonalidad h^* y saturación C^*) se presenta un comportamiento similar: la saturación disminuye en todos los casos, mientras que la luminosidad y la tonalidad no presentan una tendencia establecida. El análisis estadístico demuestra que las diferencias presentadas en el color con el cambio del pH son significativas, a pesar de que para la guayaba son menores.

▪ *Neutralización de pulpas amarillas.*

En la Figura D-3 se presentan los resultados para la evaluación de la neutralización en pulpas amarillas (mango, uchuva y maracuyá). En la Figura D-3(A) puede verse que el mango destaca en comparación con la uchuva y el maracuyá, ya que luego de la adición de 1mL de NaOH el pH aumentó a casi 6,5. Para la uchuva y el maracuyá, después de adicionar 6mL de la solución de hidróxido, el pH fue de 5,5 y 4,0 respectivamente. El cambio del color con la adición de NaOH es baja (Figura D-3(B)), en especial para la uchuva y el maracuyá, en donde se resalta por la similitud para las tres coordenadas. El cambio en las coordenadas del color es pequeño, también lo es el aumento en el pH, especialmente en el maracuyá. En el caso de la uchuva, aunque el color permaneció estable se requiere una cantidad alta de NaOH para aumentar el pH de la pulpa hasta 5,6 (20% v/p).



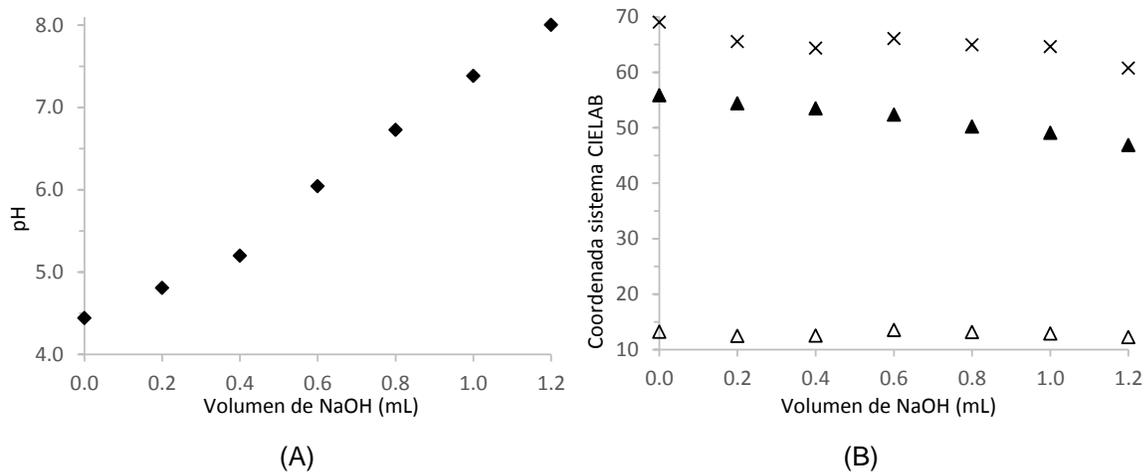
pH: pulpa de mango (Δ); pulpa de uchuva (o); pulpa de maracuyá (x).

Coordenadas en el sistema CIELAB. Pulpa de mango: L^* (\blacktriangle), a^* (\triangle), b^* (\times). Pulpa de uchuva: L^* (\bullet), a^* (\circ), b^* (\times). Pulpa de maracuyá: L^* (\blacksquare), a^* (\square), b^* (\times).

Figura D-3. pH (A) y coordenadas del color (B) en la neutralización de las pulpas amarillas.

Con el fin de visualizar de una forma más detallada el cambio de color del mango frente a la adición de hidróxido de sodio, fue necesario hacer una neutralización adicional, agregando volúmenes de solución más pequeños (0,2mL en cada adición, frente a 1mL en los casos anteriores). Los resultados se presentan en la Figura D-4 donde se puede ver un aumento del pH con la adición de hidróxido de sodio (A), acompañado de pequeños cambios en las coordenadas del color (B). Se presenta un descenso lineal de la luminosidad al aumentar el pH. La coordenada

a^* permanece prácticamente horizontal (con pequeñas oscilaciones), mientras que la coordenada b^* disminuye con la neutralización, lo cual indica una reducción del color amarillo de la pulpa.



Coordenadas en el sistema CIELAB. Pulpa de mango: L^* (▲), a^* (△), b^* (x).

Figura D-4. pH (A) y coordenadas del color (B) en la neutralización de mango.

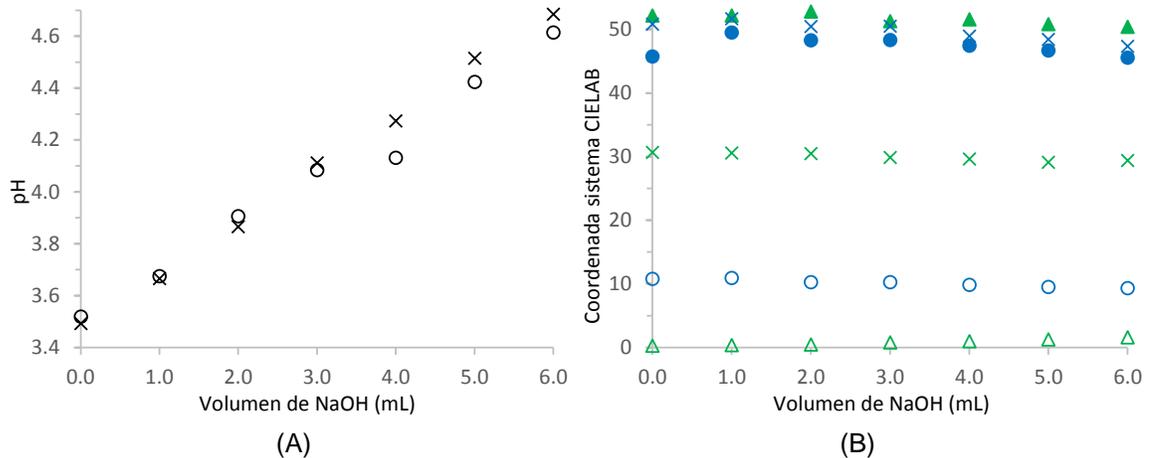
Con estos resultados se calcularon los atributos y las diferencias absolutas de color que se reportan en la Tabla 6-2. Las diferencias encontradas en las propiedades de color al neutralizar las pulpas de frutas son significativas: en todos los casos la luminosidad disminuye, mientras que tanto la tonalidad como la saturación varían sin un patrón fijo.

Las diferencias absolutas de color también son significativas en todos los casos, siendo mayores para las pulpas de uchuva, mango y maracuyá, respectivamente. Para la neutralización del mango se necesitó una décima parte del volumen de NaOH que en las pulpas de maracuyá y uchuva (0,6mL frente a 6,0mL), lo cual hace que este proceso sea más viable para el acondicionamiento de la pulpa previo a la fermentación.

Se resalta que para la pulpa de maracuyá, la diferencia absoluta de color es baja en comparación con el mango y la uchuva. Sin embargo, el pH no se incrementa a pesar de la adición del hidróxido (20% v/p), por lo que puede decirse que no hay cambios en las variables de respuesta después de la neutralización evaluada bajo las condiciones establecidas.

- *Neutralización de pulpas verdes*

En la Figura D-5 se presentan los resultados para la evaluación de la neutralización en pulpas verdes (feijoa y lulo). Es importante resaltar que para ningún caso se alcanzó un pH mayor de 4,7 después de la adición máxima de hidróxido de sodio (6mL NaOH 1N en 30g pulpa) (Figura D-5 (A)), por lo que la neutralización de éstas pulpas requieren cantidades mayores del agente neutralizante, debido a que su acidez es alta. Al igual que el comportamiento observado anteriormente en el maracuyá, no se observa una alteración importante del color de las pulpas (Figura D-5 (B)).



Coordenadas en el sistema CIELAB. Pulpa de feijoa: L^* (▲), a^* (△), b^* (×). Pulpa de lulo: L^* (●), a^* (○), b^* (×). pH: pulpa de lulo (o); pulpa de feijoa (x).

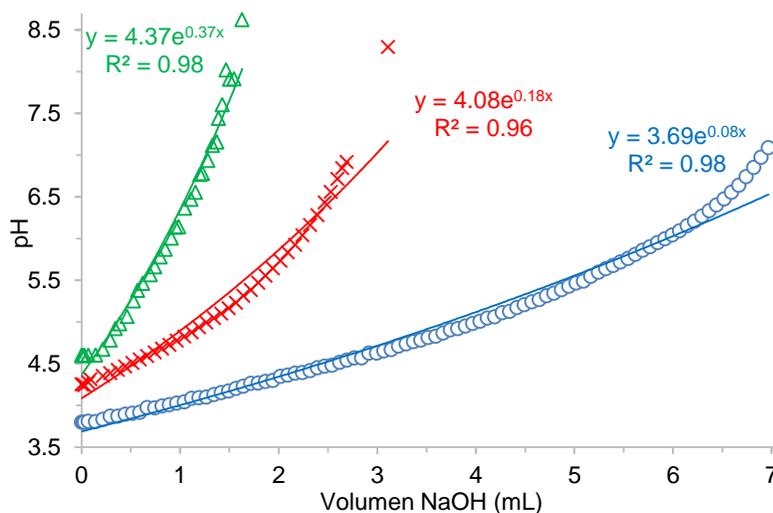
Figura D-5. pH (A) y coordenadas del color (B) en la neutralización de las pulpas verdes.

Se resalta que el comportamiento, tanto para el pH como para todas las coordenadas de color (L^* , a^* y b^*) es similar en las dos pulpas y prácticamente constante con la adición de la solución de hidróxido, en el rango de pH estudiado; es decir, al aumentar el pH las coordenadas permanecen alrededor de los mismos valores. La única diferencia importante se encuentra para la pulpa de feijoa, en la que el valor de a^* pasa de 0,25 a 1,57 y considerando que corresponde a la coordenada que va de verde a rojo, este aumento afecta significativamente el color de la pulpa. Para confirmar este comportamiento se calcularon las diferencias absolutas y los atributos de color antes y después de la neutralización (ver Tabla 6-3).

A pesar de ser bajas, las diferencias absolutas (ΔE) y las encontradas en las propiedades del color (luminosidad, tonalidad y saturación) son significativas. Esto se debe a que, incluso son una adición de 20% (v/p) de solución de hidróxido de sodio (en relación con el peso de la pulpa inicial), el cambio en el pH es bajo, tal como se discutió previamente.

Adicionalmente, se compararon los valores obtenidos para el pH en función del volumen de hidróxido de sodio adicionado, únicamente para las pulpas cuyo pH final fue mayor de 6,0 (mango, guayaba y fresa). Los resultados se presentan en la Figura D- 6.

En todos los casos los resultados se ajustan a una tendencia exponencial y las constantes de la base son similares al pH inicial de la pulpa. La principal diferencia entre las pulpas está en la constante que multiplica a la x (volumen de NaOH), siendo mayor para el mango y menor para la fresa, por ello se puede decir que este parámetro está asociado con la "facilidad" en que se neutraliza la pulpa y con la acidez titulable (a mayores valores de acidez, menores valores de éste parámetro). Por esta razón, ésta constante puede estar asociada con la naturaleza de los ácidos presentes en las frutas y sus diferentes sistemas de equilibrio (disociación).



Pulpa de mango (Δ), pulpa de fresa (○), pulpa de guayaba (x).

Figura D-6. Neutralización de mango, guayaba y fresa. pH frente al volumen de hidróxido de sodio.

- *Evaluación de la fermentación con pulpas neutralizadas.*

Considerando que el principal objetivo de la neutralización es mejorar las condiciones del sustrato para favorecer la viabilidad de las bacterias lácticas inoculadas, se realizaron ensayos de fermentación con pulpas de fresa, uchuva y lulo neutralizadas. Se esperaba un descenso del pH de las pulpas después de la incubación. Sin embargo, el pH de las pulpas antes y después es el mismo. El conteo de bacterias lácticas después de la incubación es cero en todos los casos debido a que los microorganismos inoculados no sobrevivieron a las condiciones de los sustratos.

El deterioro presentado en las propiedades sensoriales (olor, sabor y color) después de la neutralización, fue mayor después de la incubación. Debido a estos resultados se evaluó el carbonato de calcio como agente neutralizante en ensayos experimentales. Los resultados fueron similares en relación con el deterioro de las propiedades sensoriales.

Cabe resaltar que muchos de los compuestos con actividad antioxidante son los que le proporcionan el color (antocianinas, carotenoides y/o clorofilas), por lo que se consideró el posible deterioro de las propiedades bioactivas. Algunos estudios han relacionado la actividad antirradicalaria de diversos compuestos con el aumento del pH del medio en el que se encuentra. Los hallazgos muestran cambios en los mecanismos de acción y disminución de la actividad. (Nicoli *et al.*, 1999; Friedman and Jürgens, 2000; Lemańska *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2018).

En resumen, se descartó la neutralización como un tratamiento previo a la fermentación. Se observó un deterioro significativo del color y de otras propiedades que no fueron valoradas instrumentalmente como el aroma y el sabor. Adicionalmente, no se obtuvo mantenimiento ni crecimiento de las bacterias inoculadas y las propiedades bioactivas (como la actividad antioxidante) pueden verse reducidas.

Acondicionamiento de los cultivos

- *Fermentación de pulpas de frutas*

Una vez se descartó la etapa de neutralización como un proceso de adecuación del sustrato, se continuó con la evaluación del acondicionamiento del cultivo en bebidas de soya y avena. El objetivo de esta etapa previa a la incubación, es favorecer el ajuste de las bacterias lácticas inoculadas a las nuevas condiciones del sustrato. Este proceso se realizó en las condiciones establecidas previamente, Debido a la naturaleza del proceso fermentativo se esperaba un descenso en el pH y los sólidos solubles acompañado de un aumento en la acidez titulable y crecimiento bacteriano.

Los resultados obtenidos para el pH y la acidez titulable se presentan en la Figura D-6 y para los sólidos solubles y el crecimiento bacteriano en la Figura D-7.

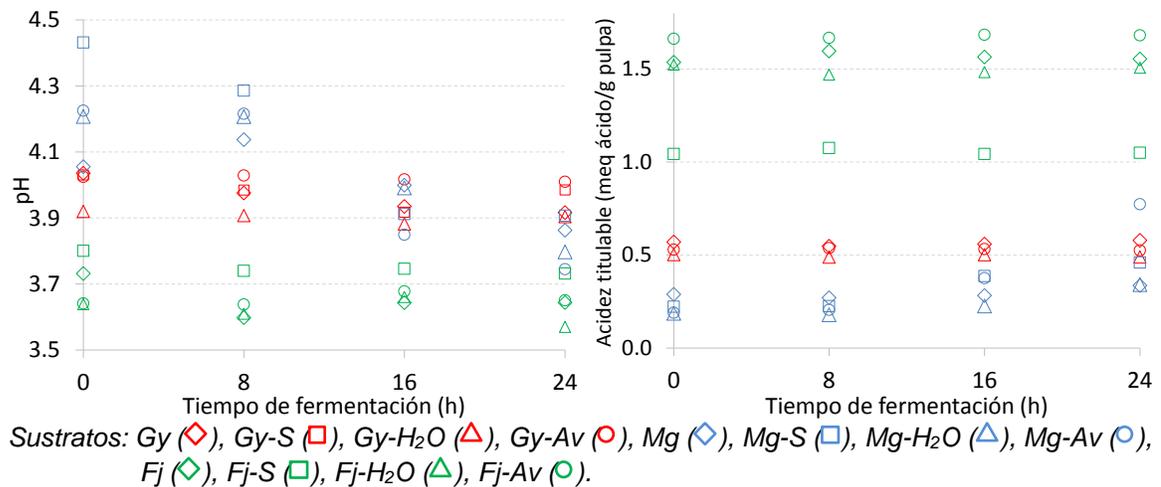


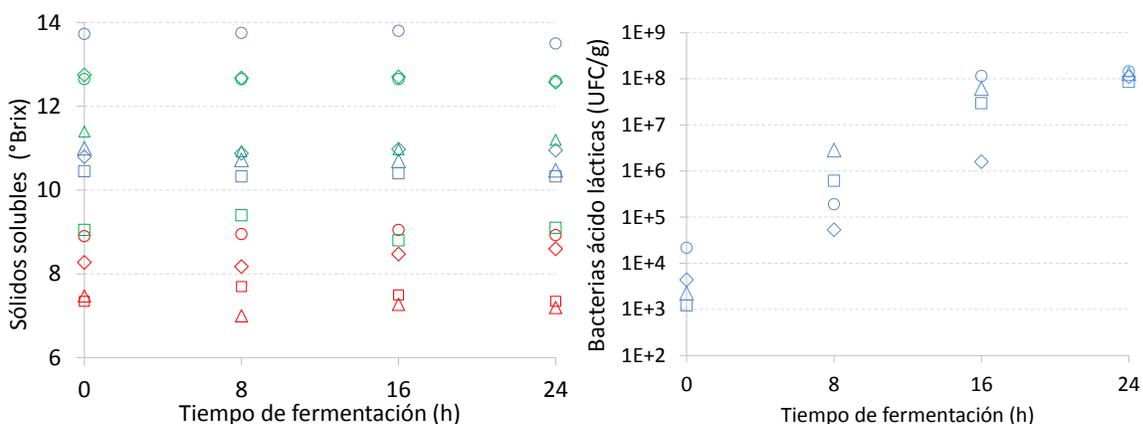
Figura D-7 pH y acidez titulable durante la fermentación láctica de pulpa de frutas, con y sin acondicionamiento del cultivo.

Se observan tendencias horizontales para el pH, la acidez titulable y los sólidos solubles en las pulpas de guayaba y feijoa a lo largo del tiempo de fermentación y ya que no se observó ni crecimiento ni mantenimiento microbiano de las bacterias inoculadas, se considera que no sobrevivieron a las condiciones de los sustratos.

El análisis estadístico permitió comparar los cuatro tipos de sustratos: (1) la pulpa pura (sin acondicionamiento), (2) la pulpa con acondicionamiento en agua, (3) la pulpa con acondicionamiento en avena y (4) la pulpa con acondicionamiento en soya, antes y después de 24 horas de incubación y una muestra que se incubó sin inóculo (control). Los resultados para la guayaba se reportan en la Tabla D-5, donde puede observarse que no hay las diferencias significativas en los sólidos solubles (^oBrix) ni en la acidez titulable.

Al comparar el pH de las muestras iniciales (t=0) y después de 24h de incubación, solo hay diferencias significativas en la pulpa pura (pH = 4,036). Sin embargo, esta diferencia se descarta cuando se comparan las dos muestras incubadas: con y sin inóculo (control), por lo que, la

diferencia inicial se debe únicamente al proceso de incubación, no por acción de las bacterias inoculadas.



Sustratos: Gy (◊), Gy-S (◻), Gy-H₂O (△), Gy-Av (○), Mg (◊), Mg-S (◻), Mg-H₂O (△), Mg-Av (○), Fj (◊), Fj-S (◻), Fj-H₂O (△), Fj-Av (○).

Figura D-5. Sólidos solubles y crecimiento bacteriano durante la fermentación láctica de pulpa de frutas, con y sin acondicionamiento del cultivo.

Tabla D-5. Propiedades fisicoquímicas antes y después de la incubación de guayaba, con y sin acondicionamiento del cultivo.

Tratamiento	Tiempo incubación (h)	°Brix	pH	Acidez titulable (meq. ácido / g pulpa)
Guayaba (Gy) sin acondicionamiento	0	8,3 ± 0,9 ^a	4,036 ± 0,084 ^a	0,089 ± 0,007 ^a
	24	8,6 ± 0,9 ^a	3,917 ± 0,024 ^{bc}	0,090 ± 0,005 ^a
	24 (Control)	8,0 ± 1,2 ^a	3,911 ± 0,051 ^{bc}	0,087 ± 0,012 ^a
Guayaba-Agua (Gy-H ₂ O)	0	7,5 ± 1,2 ^a	3,920 ± 0,063 ^{bc}	0,079 ± 0,011 ^a
	24	7,2 ± 0,9 ^a	3,905 ± 0,032 ^c	0,077 ± 0,010 ^a
	24 (Control)	7,2 ± 1,2 ^a	3,910 ± 0,046 ^c	0,075 ± 0,014 ^a
Guayaba-Avena (Gy-Av)	0	8,9 ± 0,2 ^a	4,025 ± 0,015 ^a	0,083 ± 0,000 ^a
	24	8,9 ± 0,2 ^a	4,010 ± 0,021 ^{ab}	0,082 ± 0,001 ^a
	24 (Control)	8,9 ± 0,1 ^a	3,993 ± 0,003 ^{abc}	0,083 ± 0,000 ^a
Guayaba-Soya (Gy-S)	0	7,4 ± 0,1 ^a	4,031 ± 0,025 ^a	0,079 ± 0,001 ^a
	24	7,4 ± 0,1 ^a	3,986 ± 0,010 ^{abc}	0,082 ± 0,000 ^a
	24 (Control)	7,4 ± 0,1 ^a	4,067 ± 0,004 ^a	0,075 ± 0,000 ^a

Los valores medios ± SD (n=2) que no comparten una letra, en la misma columna, son significativamente diferentes con un nivel de confianza del 95%.

Se presenta un descenso significativo en el pH de la pulpa inicial (t = 0) cuando el cultivo se ha acondicionado previamente en agua. Después de la incubación, la principal diferencia se encuentra entre las pulpas con acondicionamiento previo en avena y agua. Sin embargo, con respecto a las muestras control, las principales diferencias se observan entre las pulpas con acondicionamiento en agua y soya. Si se relacionan las variaciones en el pH (3,9 - 4,1) con la

conservación de la pulpa o la percepción organoléptica, las diferencias serán poco significativas, a pesar de los resultados del análisis estadístico.

Los resultados para el análisis de la fermentación de la pulpa de feijoa se presentan en la Tabla D-6. Se observan diferencias significativas en todas las propiedades valoradas. Cabe destacar que, en general, las muestras con acondicionamiento del cultivo en bebida de soya difieren significativamente de las demás, sin embargo, no se observan diferencias entre las muestras incubadas ($t = 24h$) y sin incubar ($t = 0$).

Tabla D-6. Propiedades fisicoquímicas antes y después de la incubación de feijoa, con y sin acondicionamiento del cultivo.

Tratamiento	Tiempo incubación (h)	°Brix	pH	Acidez titulable (meq. ácido / g pulpa)
Feijoa (Fj) sin acondicionamiento	0	12,8 ± 1,0 ^{ab}	3,732 ± 0,044 ^a	0,240 ± 0,041 ^a
	24	12,6 ± 0,7 ^{abcd}	3,644 ± 0,039 ^b	0,243 ± 0,032 ^a
	24 (Control)	13,0 ± 0,3 ^a	3,634 ± 0,025 ^{bc}	0,254 ± 0,008 ^a
Feijoa-Agua (Fj-H ₂ O)	0	11,4 ± 1,1 ^{bcd}	3,639 ± 0,062 ^b	0,238 ± 0,026 ^a
	24	11,2 ± 1,0 ^{cd}	3,570 ± 0,033 ^{cd}	0,235 ± 0,022 ^a
	24 (Control)	11,1 ± 0,8 ^d	3,559 ± 0,009 ^d	0,233 ± 0,019 ^a
Feijoa-Avena (Fj-Av)	0	12,7 ± 0,1 ^{abc}	3,642 ± 0,004 ^b	0,260 ± 0,000 ^a
	24	12,6 ± 0,4 ^{abc}	3,651 ± 0,008 ^b	0,263 ± 0,002 ^a
	24 (Control)	12,9 ± 0,1 ^{ab}	3,615 ± 0,015 ^{bcd}	0,263 ± 0,002 ^a
Feijoa-Soya (Fj-S)	0	9,1 ± 0,1 ^e	3,800 ± 0,001 ^a	0,163 ± 0,001 ^b
	24	9,1 ± 0,1 ^e	3,732 ± 0,000 ^a	0,164 ± 0,001 ^b
	24 (Control)	9,1 ± 0,0 ^e	3,764 ± 0,002 ^a	0,165 ± 0,001 ^b

Los valores medios ± SD ($n=2$) que no comparten una letra, en la misma columna, son significativamente diferentes con un nivel de confianza del 95%.

Para los sólidos solubles no se observan diferencias significativas de las muestras que fueron incubadas y las que no. Tampoco se observan diferencias significativas debidas a al acondicionamiento en avena o agua, entre las muestras iniciales ($t=0$), ni entre las muestras incubadas ($t=24h$). Sin embargo, se observa un descenso significativo en los sólidos solubles de las muestras control debido a la adición de agua proveniente del acondicionamiento del cultivo.

El comportamiento encontrado para el pH es igual que el obtenido para las otras propiedades cuando realiza el acondicionamiento en soya o avena, pero cuando se evalúa esta propiedad en la pulpa pura o con adición de agua se encuentra un descenso significativo en las muestras antes y después de 24h de incubación. A pesar de ello, al comparar las muestras incubadas con y sin inóculo (control) la diferencia encontrada ya no es significativa. Excluyendo las muestras acondicionadas en soya, se observa que el acondicionamiento en agua y avena produce un descenso significativo en el pH de la feijoa. Si se relaciona la variación del pH (entre 3,6 y 3,7) con la conservación de la pulpa o la percepción organoléptica, no hay diferencias pese a que el análisis estadístico indique lo contrario.

En consecuencia, y ya que el conteo de bacterias lácticas fue nulo para todas las muestras evaluadas, se concluye que no hubo fermentación láctica en las pulpas de guayaba y feijoa.

Para la pulpa de mango se observó descenso en el pH y aumento en la acidez titulable (Figura D-7) obtenido principalmente por el mantenimiento y crecimiento de las bacterias incubadas (Figura D-8). Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla D-7.

Tabla D-7. Propiedades fisicoquímicas antes y después de la incubación de mango, con y sin acondicionamiento del cultivo.

Tratamiento	Tiempo incubación (h)	°Brix	pH	Acidez titulable (meq. ácido / g pulpa)
Mango (Mg) sin acondicionamiento	0	10,9 ± 1,6 ^a	4,226 ± 0,039 ^a	0,030 ± 0,006 ^d
	24	10,8 ± 1,7 ^a	3,853 ± 0,043 ^c	0,053 ± 0,012 ^{bc}
	24 (Control)	10,8 ± 1,6 ^a	4,278 ± 0,027 ^a	0,030 ± 0,007 ^d
Mango-Agua (Mg-H ₂ O)	0	11,0 ± 1,1 ^a	4,208 ± 0,185 ^a	0,029 ± 0,009 ^d
	24	10,5 ± 1,9 ^a	3,797 ± 0,116 ^c	0,053 ± 0,011 ^{bc}
	24 (Control)	10,7 ± 1,8 ^a	4,153 ± 0,165 ^{ab}	0,029 ± 0,008 ^d
Mango-Avena (Mg-Av)	0	12,7 ± 1,4 ^a	4,225 ± 0,049 ^a	0,030 ± 0,001 ^d
	24	12,5 ± 2,1 ^a	3,771 ± 0,016 ^c	0,106 ± 0,003 ^a
	24 (Control)	12,4 ± 2,1 ^a	4,221 ± 0,014 ^a	0,030 ± 0,001 ^d
Mango-Soya (Mg-S)	0	10,5 ± 1,9 ^a	4,432 ± 0,120 ^a	0,032 ± 0,008 ^{cd}
	24	10,4 ± 2,0 ^a	3,907 ± 0,178 ^{bc}	0,072 ± 0,020 ^b
	24 (Control)	10,4 ± 1,9 ^a	4,436 ± 0,124 ^a	0,032 ± 0,008 ^{cd}

Los valores medios ± SD (n=3) que no comparten una letra, en la misma columna, son significativamente diferentes con un nivel de confianza del 95%.

Las diferencias presentadas en los sólidos solubles (°Brix) no son significativas y las desviaciones de los datos son altas en comparación con las obtenidas para las pulpas de guayaba y feijoa. Ya que se tiene crecimiento de las bacterias inoculadas, se esperaba un descenso en esta propiedad, en especial, si se considera como una medida indirecta de los carbohidratos solubles (fuentes de carbono), que son los componentes que más inciden en la medida.

A pesar de ello, pueden presentarse dos fenómenos que compensan el consumo de los azúcares ya que afectan el índice de refracción de la luz: el primero la hidrólisis de la sacarosa en glucosa y fructosa, considerando que las bacterias consumen preferentemente el primero, la fructosa se acumula en el medio influyendo en la medida; y el segundo la producción de ácidos orgánicos. Este comportamiento también puede sugerir que las bacterias inoculadas prefieren una fuente de carbono diferente de la sacarosa, glucosa o fructosa, que no afecte significativamente el índice de refracción. Para poder confirmar o negar estas afirmaciones es importante realizar análisis específicos que permitan aclarar la variación de algunos carbohidratos (sacarosa, glucosa y fructosa).

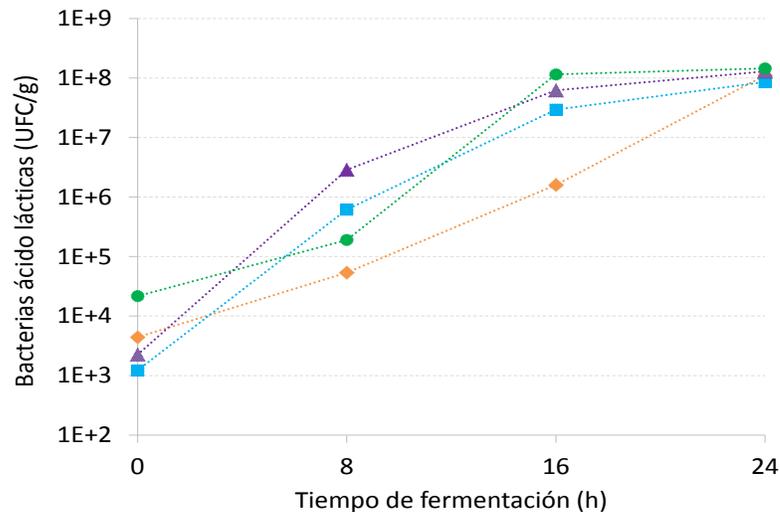
No se observa una diferencia significativa entre los valores de pH en las muestras iniciales y en los controles para ninguna de las pulpas. Sin embargo, el descenso producido por el crecimiento bacteriano es significativo después de 24h de incubación. Bajo las condiciones en las que se realizaron los ensayos, es de destacar que no se presenta una diferencia significativa en los valores de pH de las pulpas, cuando se fermentan con o sin acondicionamiento del cultivo en agua, soya o avena.

Para los valores de la acidez titulable no se observan diferencias al comparar las muestras iniciales con los controles, lo cual indica que el proceso de incubación no afecta el valor de la acidez si la pulpa no ha sido inoculada. Cuando la pulpa se inocula, el aumento de acidez es significativo especialmente en las muestras con acondicionamiento previo del cultivo.

Se tiene un aumento aproximado del 16% de la acidez titulable en la pulpa pura (con adición directa de cultivo), frente a las pulpas con acondicionamiento en agua (82%), en soya (125%) y en avena (257%). Por lo tanto, si se evalúa la fermentación láctica considerando el aumento de acidez (producción de ácido láctico) se puede decir que el rendimiento aumenta considerablemente cuando se realiza el acondicionamiento previo del cultivo.

Se observa un crecimiento de las bacterias inoculadas durante el tiempo de fermentación evaluado (ver Figura D-9), después de 24h de fermentación el conteo de bacterias lácticas llega a 1×10^8 UFC/g, cumpliendo con los niveles mínimos establecidos en un alimento con probióticos para tener una actividad funcional en el consumidor (1×10^6 UFC/g).

A pesar de que la concentración de bacterias inicial es diferente, al cabo de 24h de fermentación es igual para todas las muestras. En consecuencia, desde el punto de vista del crecimiento microbiano, el acondicionamiento previo del cultivo en agua, bebida de avena o bebida de soya no implica un cambio en el rendimiento del proceso.



Sustratos: Mg sin acondicionamiento (◆), Mg-S (■), Mg-H₂O (▲), Mg-Av (●)

Figura D-9. Crecimiento bacteriano durante la fermentación de pulpa de mango con y sin acondicionamiento del cultivo.

En las ocho primeras horas de fermentación se observa un crecimiento rápido de las bacterias en las pulpas con acondicionamiento en agua y soya, que continúa en las ocho horas siguientes, pero con una velocidad menor. En la pulpa con acondicionamiento en avena la velocidad de crecimiento durante las primeras ocho horas es menor a la observada para las otras pulpas; en las siguientes ocho horas de incubación, esta velocidad aumenta significativamente y prácticamente es nula en las últimas ocho horas de proceso. Para la pulpa sin acondicionamiento previo se observa un aumento en la velocidad de crecimiento con el tiempo de fermentación y a

pesar de que el conteo de bacterias es menor a las 8 y 16 horas de proceso, se puede ver que luego de 24h de incubación alcanza al de las otras muestras.

En conclusión y de acuerdo con los resultados obtenidos, solo la pulpa de mango funcionó adecuadamente como sustrato para las bacterias ácido lácticas inoculadas (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*).

El acondicionamiento en sustancias prebióticas como la bebida de soya y de avena, favoreció la acidificación de las pulpas. Sin embargo, su influencia sobre la velocidad del crecimiento bacteriano es pequeña y puede deberse a la dilución, considerando que se observa un comportamiento similar al acondicionar el cultivo en agua.

Se obtuvo una alta viabilidad de microorganismos al cabo de 24 horas de fermentación para todas las pulpas de mango (con y sin acondicionamiento previo). Por lo tanto es recomendable continuar los ensayos de fermentación con adición directa del cultivo en la pulpa pura o con acondicionamiento en agua.

- *Fermentación de pulpas de hortalizas*

Debido a que la acidez titulable y el pH de las pulpas de hortalizas son favorables para el crecimiento de las bacterias lácticas, no se consideró la neutralización. Al igual que para las pulpas de frutas se evaluó la influencia del acondicionamiento del cultivo en ingredientes con características prebióticas (bebidas de soya o avena) empleando como variables de respuesta pH, acidez titulable, sólidos solubles y bacterias ácido lácticas. Posteriormente se evaluó la fermentación bajo las mismas condiciones pero empleando diferentes cultivos. Los resultados obtenidos para el pH y la acidez de las pulpas de hortalizas se presentan en la Figura D-10 y en la Figura D-11 los sólidos solubles y el conteo de bacterias lácticas.

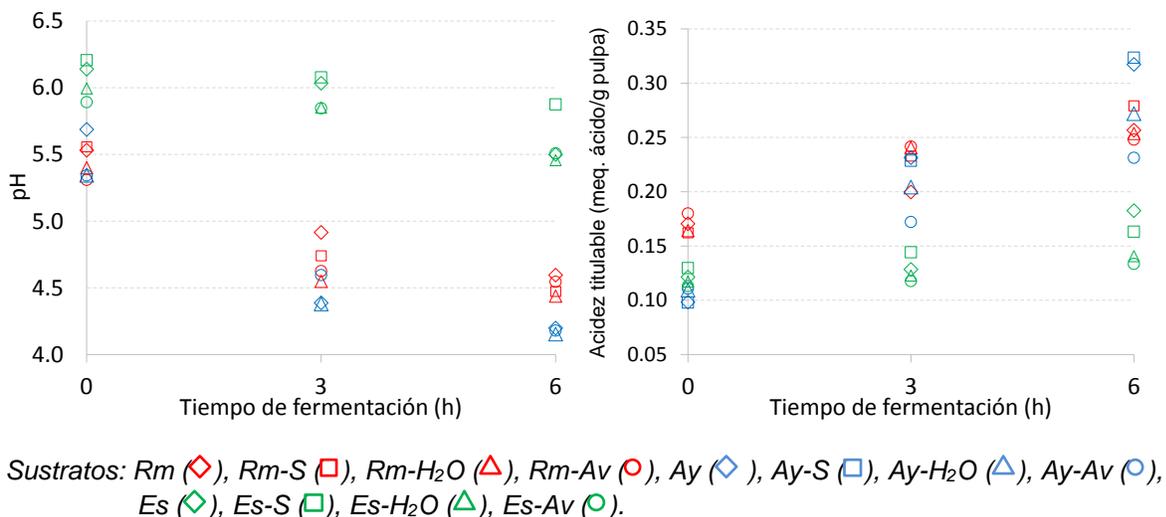
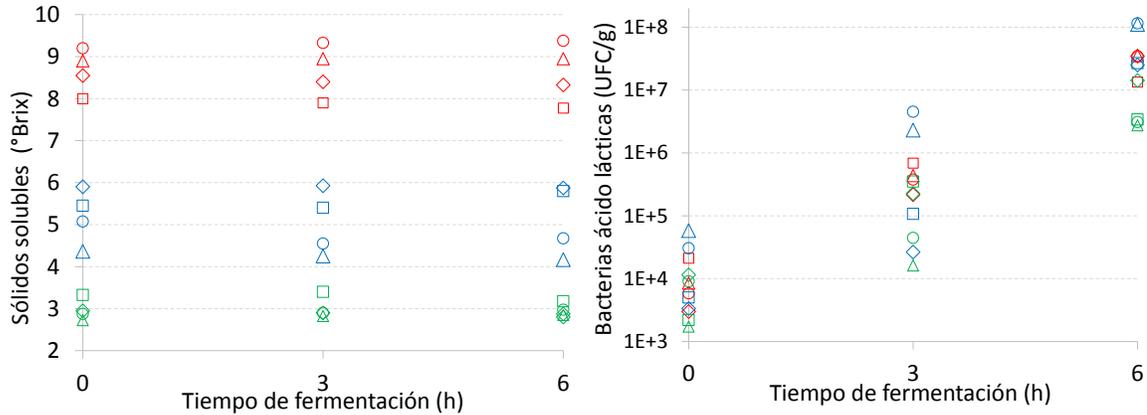


Figura D-10 pH y acidez titulable durante la fermentación láctica de hortalizas, con y sin acondicionamiento del cultivo



Sustratos: Rm (◊), Rm-S (◻), Rm-H₂O (△), Rm-Av (○), Ay (◊), Ay-S (◻), Ay-H₂O (△), Ay-Av (○), Es (◊), Es-S (◻), Es-H₂O (△), Es-Av (○).

Figura D-11 Sólidos solubles y conteo de bacterias lácticas durante la fermentación de hortalizas, con y sin acondicionamiento del cultivo.

En general, el comportamiento de las variables es el esperado de acuerdo con la naturaleza del proceso fermentativo: se presenta un descenso en el pH y un aumento de acidez titulable. A pesar de que esta pauta se presenta en todas las pulpas de hortalizas, es más notable en las pulpas de remolacha y ahuyama. Se esperaba un descenso en los sólidos solubles, pero permanecen constantes a lo largo de toda la fermentación para todas las pulpas, posiblemente debido que el consumo de los carbohidratos disponibles es compensado con una hidrólisis de la sacarosa presente en la pulpa y la producción de ácido láctico de forma simultánea. Para todas las pulpas se observó un crecimiento de las bacterias inoculadas durante las seis horas en las que se realizó la fermentación.

▪ *Resultados para la pulpa de remolacha*

Para comparar los resultados de la evaluación del acondicionamiento, en la Tabla D-8 se presentan los resultados obtenidos para las propiedades fisicoquímicas antes y después de la incubación.

Se confirma que no hay diferencias significativas en los sólidos solubles para ninguna de las pulpas. Se observa un descenso significativo en el pH antes y después de la fermentación, pero no entre la muestra inicial y el control (pulpa incubada por 6h, pero sin inoculación de bacterias lácticas). Tampoco existe una diferencia significativa del pH entre las muestras que se fermentaron sin o con el acondicionamiento del cultivo en otros ingredientes (agua, bebida de avena o soya).

Después de la fermentación se presenta un aumento significativo en la acidez titulable de las pulpas con excepción de la muestra fermentada con acondicionamiento previo en avena. Para la pulpa sin acondicionamiento es aproximadamente del 50% y para las pulpas acondicionadas en agua es del 55%, en soya del 72% y en avena del 38%. No se evidencia una diferencia significativa al comparar la acidez de las pulpas al inicio de la fermentación con el control. En ningún caso el acondicionamiento del cultivo produjo un cambio significativo en las diferentes variables valoradas.

Tabla D-8. Propiedades fisicoquímicas antes y después de la incubación de remolacha, con y sin acondicionamiento del cultivo.

Tratamiento	Tiempo incubación (h)	°Brix	pH	Acidez titulable (meq. ácido / g pulpa)
Remolacha sin acondicionamiento (Rm)	0	8,6 ± 1,6 ^a	5,532 ± 0,046 ^a	0,027 ± 0,004 ^{de}
	6	8,3 ± 1,6 ^a	4,595 ± 0,216 ^b	0,040 ± 0,011 ^{ab}
	6 (Control)	8,6 ± 1,5 ^a	5,546 ± 0,035 ^a	0,029 ± 0,004 ^{bcde}
Remolacha-Agua (Rm-H ₂ O)	0	8,9 ± 0,1 ^a	5,399 ± 0,021 ^a	0,026 ± 0,001 ^e
	6	9,0 ± 0,3 ^a	4,438 ± 0,057 ^b	0,040 ± 0,002 ^{abc}
	6 (Control)	9,2 ± 0,5 ^a	5,466 ± 0,236 ^a	0,026 ± 0,001 ^{de}
Remolacha-Avena (Rm-Av)	0	9,2 ± 0,3 ^a	5,309 ± 0,186 ^a	0,028 ± 0,002 ^{bcde}
	6	9,4 ± 0,1 ^a	4,545 ± 0,192 ^b	0,039 ± 0,005 ^{abcd}
	6 (Control)	9,3 ± 0,2 ^a	5,544 ± 0,075 ^a	0,027 ± 0,003 ^{cde}
Remolacha-Soya (Rm-S)	0	8,0 ± 1,2 ^a	5,557 ± 0,170 ^a	0,025 ± 0,005 ^e
	6	7,8 ± 1,2 ^a	4,473 ± 0,136 ^b	0,044 ± 0,009 ^a
	6 (Control)	7,8 ± 1,5 ^a	5,608 ± 0,098 ^a	0,026 ± 0,003 ^e

Los valores medios ± SD (n=3) que no comparten una letra, en la misma columna, son significativamente diferentes con un nivel de confianza del 95%.

En cuanto al crecimiento bacteriano el conteo aumenta en los mismos órdenes de magnitud en todos los casos, pasando aproximadamente de 10³ UFC/g a 10⁷ UFC/g al final de las seis horas de fermentación. No se observa un efecto del acondicionamiento previo sobre el conteo microbiológico (ver detalle posteriormente en la Tabla D-11).

▪ *Resultados para la pulpa de ahuyama*

Los resultados para la evaluación del acondicionamiento en pulpa de ahuyama se presentan en la Tabla D-9. No se hay diferencias significativas al comparar los sólidos solubles de las diferentes muestras antes y después de la fermentación. En relación con la pulpa sin acondicionamiento, se presenta un descenso significativo en los sólidos solubles de las muestras a las que se les adicionó el cultivo acondicionado en agua. Para el pH las diferencias significativas se deben únicamente al proceso de fermentación y no al acondicionamiento en agua, avena o soya.

En cuanto a la acidez titulable se presenta un aumento en todas las muestras incubadas. No obstante, este incremento es significativo únicamente cuando se produce la fermentación de las pulpas. No hay diferencias significativas cuando se fermenta la pulpa sin y con acondicionamiento en bebida de soya, pero el desarrollo de acidez es significativamente menor cuando se acondiciona el cultivo en agua o avena. Se encontró un aumento en la acidez titulable del 222% en la ahuyama sin acondicionamiento previo del cultivo, 145% cuando se acondiciona en agua, 108% en avena y 260% en soya. Por esta razón se puede decir que la producción de ácido láctico tiene un mayor rendimiento cuando se acondiciona previamente el cultivo en bebida de soya.

Con la fermentación se percibe un aumento en el conteo bacteriano, pasando aproximadamente de 10³ o 10⁴ UFC/g a 10⁷ o 10⁸ UFC/g, por lo que no se considera que el acondicionamiento previo influya de forma importante sobre las bacterias lácticas inoculadas (ver más adelante en la Tabla D-11).

Tabla D-9. Propiedades fisicoquímicas antes y después de la incubación de ahuyama, con y sin acondicionamiento del cultivo.

ID	Tiempo incubación (h)	°Brix	pH	Acidez titulable (meq. ácido /g pulpa)
Ahuyama sin acondicionamiento (Ay)	0	5,9 ± 0,8 ^a	5,687 ± 0,494 ^a	0,015 ± 0,005 ^c
	6	5,9 ± 0,8 ^a	4,198 ± 0,131 ^b	0,050 ± 0,002 ^a
	6 (Control)	5,9 ± 0,8 ^{ab}	5,545 ± 0,622 ^a	0,017 ± 0,007 ^c
Ahuyama-Agua (Ay-H ₂ O)	0	4,2 ± 0,1 ^{bc}	5,342 ± 0,153 ^a	0,017 ± 0,001 ^c
	6	4,1 ± 0,2 ^c	4,179 ± 0,186 ^b	0,043 ± 0,003 ^{ab}
	6 (Control)	3,9 ± 0,2 ^c	5,483 ± 0,013 ^a	0,015 ± 0,002 ^c
Ahuyama-Avena (Ay-Av)	0	5,1 ± 0,4 ^{abc}	5,346 ± 0,112 ^a	0,017 ± 0,001 ^c
	6	4,7 ± 0,3 ^{abc}	4,158 ± 0,151 ^b	0,036 ± 0,003 ^b
	6 (Control)	4,5 ± 0,1 ^{abc}	5,719 ± 0,348 ^a	0,014 ± 0,000 ^c
Ahuyama-Soya (Ay-S)	0	5,5 ± 0,9 ^{abc}	5,971 ± 0,330 ^a	0,014 ± 0,004 ^c
	6	5,8 ± 0,8 ^{ab}	4,121 ± 0,064 ^b	0,051 ± 0,007 ^a
	6 (Control)	5,4 ± 1,1 ^{abc}	5,483 ± 0,885 ^a	0,018 ± 0,007 ^c

Los valores medios ± SD (n=3) que no comparten una letra, en la misma columna, son significativamente diferentes con un nivel de confianza del 95%.

▪ *Resultados para la pulpa de espinaca*

En la Tabla D- 10 se presentan los resultados obtenidos para la fermentación de pulpa de espinaca después del acondicionamiento del cultivo en agua, bebida de avena o de soya.

Tabla D-10. Propiedades fisicoquímicas antes y después de la incubación de espinaca, con y sin acondicionamiento del cultivo.

ID	Tiempo incubación (h)	°Brix	pH	Acidez titulable (meq. ácido /g pulpa)
Espinaca sin acondicionamiento (Es)	0	3,0 ± 0,1 ^{ab}	6,139 ± 0,186 ^{ab}	0,019 ± 0,002 ^b
	6	2,8 ± 0,2 ^{ab}	5,499 ± 0,326 ^{cd}	0,028 ± 0,011 ^a
	6 (Control)	2,9 ± 0,1 ^{ab}	6,099 ± 0,275 ^{ab}	0,019 ± 0,001 ^b
Espinaca-Agua (Es-H ₂ O)	0	2,8 ± 0,1 ^b	5,994 ± 0,013 ^{ab}	0,018 ± 0,000 ^b
	6	2,9 ± 0,2 ^{ab}	5,457 ± 0,022 ^d	0,022 ± 0,001 ^{ab}
	6 (Control)	2,9 ± 0,2 ^{ab}	6,002 ± 0,012 ^{ab}	0,018 ± 0,000 ^b
Espinaca-Avena (Es-Av)	0	2,9 ± 0,4 ^{ab}	5,892 ± 0,074 ^{bcd}	0,018 ± 0,002 ^b
	6	3,0 ± 0,4 ^{ab}	5,508 ± 0,081 ^{cd}	0,021 ± 0,003 ^{ab}
	6 (Control)	2,9 ± 0,4 ^{ab}	5,969 ± 0,073 ^{bc}	0,017 ± 0,002 ^b
Espinaca-Soya (Es-S)	0	3,3 ± 0,3 ^{ab}	6,206 ± 0,073 ^{ab}	0,020 ± 0,002 ^{ab}
	6	3,2 ± 0,5 ^{ab}	5,874 ± 0,397 ^{bcd}	0,026 ± 0,001 ^{ab}
	6 (Control)	3,4 ± 0,2 ^a	6,456 ± 0,233 ^a	0,020 ± 0,001 ^{ab}

Los valores medios ± SD (n=3) que no comparten una letra, en la misma columna, son significativamente diferentes con un nivel de confianza del 95%.

Se observan diferencias significativas únicamente en dos muestras, ya que corresponden al valor máximo y mínimo, respectivamente: el control de la pulpa con acondicionamiento en bebida de soya y la muestra inicial del acondicionamiento con agua. Sin embargo, en ningún caso se observan diferencias antes y después de la incubación.

Para el pH no hay diferencias significativas entre las muestras iniciales y los controles. Después de la fermentación, el pH desciende en todas las pulpas, pero solo es significativo para la pulpa sin y con acondicionamiento en agua. Tampoco se observan cambios significativos al comparar las muestras fermentadas (6h de proceso), con y sin el acondicionamiento del cultivo (ya sea en agua, avena o soya), aunque estos resultados pueden deberse a las altas desviaciones que tienen algunas muestras.

En relación con los resultados obtenidos para la acidez titulable, solo se presenta un aumento significativo al comparar la pulpa pura (sin acondicionamiento) inicial y el control con la pulpa luego de la fermentación (6h). Con la fermentación se obtuvo un aumento del 50% en la acidez de la pulpa sin acondicionamiento, del 20% en la pulpa acondicionada en agua, del 26% en soya y del 18% en avena. Por lo tanto, no se observa influencia del acondicionamiento del cultivo.

Se destaca que los valores de sólidos solubles en la pulpa de espinaca son más bajos en relación con los valorados para las pulpas de remolacha y de ahuyama. Esto puede afectar la disponibilidad de fuentes de carbono y, a su vez, el crecimiento microbiano, dando como resultado, menores valores de acidez titulable y en consecuencia, valores de pH elevados después de la fermentación, lo cual puede dificultar su conservación.

En la Tabla D-11 se presenta el detalle del conteo microbiano obtenido y permite comparar los resultados para las diferentes pulpas con y sin acondicionamiento.

Tabla D-11. Detalle del conteo bacteriano de las pulpas de hortalizas fermentadas con y sin acondicionamiento previo del cultivo.

Acondicionamiento	Tiempo de incubación (h)	Remolacha (Rm)	Ahuyama (Ay)	Espinaca (Es)
Sin acondicionamiento (adición directa)	0	$3,0 \times 10^3$	$3,4 \times 10^3$	$1,2 \times 10^4$
	3	$2,2 \times 10^5$	$2,7 \times 10^4$	$2,3 \times 10^5$
	6	$3,5 \times 10^7$	$2,5 \times 10^7$	$1,4 \times 10^7$
Agua	0	$8,5 \times 10^3$	$5,8 \times 10^4$	$1,7 \times 10^3$
	3	$4,4 \times 10^5$	$2,3 \times 10^6$	$1,6 \times 10^4$
	6	$3,5 \times 10^7$	$1,1 \times 10^8$	$2,8 \times 10^6$
Bebida de avena	0	$5,9 \times 10^3$	$3,1 \times 10^4$	$9,1 \times 10^3$
	3	$3,8 \times 10^5$	$4,5 \times 10^6$	$4,5 \times 10^4$
	6	$3,4 \times 10^7$	$1,2 \times 10^8$	$3,1 \times 10^6$
Bebida de soya	0	$2,1 \times 10^4$	$5,0 \times 10^3$	$2,2 \times 10^3$
	3	$6,9 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$	$3,5 \times 10^5$
	6	$1,4 \times 10^7$	$2,7 \times 10^7$	$3,4 \times 10^6$

Solo en la pulpa sin tratamiento se alcanza el mismo nivel del crecimiento microbiano que en las pulpas de remolacha y ahuyama, lo cual concuerda con los resultados discutidos previamente. No se obtuvo crecimiento en ninguno de los controles, por lo que no se incluyen en la tabla. En todos los casos el nivel de concentración de las bacterias lácticas al final del proceso fue mayor que el mínimo requerido (1×10^6 UFC/g) para que se considere como un alimento funcional debido a la viabilidad de las bacterias lácticas.

En resumen, todas las pulpas de las hortalizas evaluadas funcionan adecuadamente como sustrato para el mantenimiento y crecimiento de las bacterias ácido lácticas inoculadas (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*). Bajo las condiciones del ensayo realizado, no se observó una influencia importante del acondicionamiento del cultivo en diferentes sustancias con actividad prebiótica, ya que, se presentan cambios en algunas variables fisicoquímicas (para algunas pulpas), pero no sobre el crecimiento de las bacterias lácticas inoculadas. Por lo tanto, es aconsejable realizar la fermentación con adición directa del cultivo en la pulpa pura o acondicionamiento previo en agua.

ANEXO E. Resultados de fermentación de hortalizas empleando otros cultivos.

Se realizaron fermentaciones con los cultivos mixtos 1 y 2. Los resultados se presentan en Tabla E-1 y permiten comparar las propiedades de las pulpas antes y después de la fermentación.

Tabla E-1. Propiedades fisicoquímicas y conteo bacteriano antes y después de la incubación de hortalizas, con diferentes cultivos.

Mezcla	Cultivo	Tiempo incubación (h)	°Brix	pH	Acidez titulable (meq. ácido /g pulpa)	Conteo bacteriano (UFC/g)
Remolacha	Mixto 1	0	9,9 ± 0,3 ^a	6,200 ± 0,034 ^{ab}	0,019 ± 0,002 ^{de}	1,6 x 10 ⁴
		6	9,4 ± 0,6 ^a	5,453 ± 0,151 ^c	0,054 ± 0,027 ^c	3,2 x 10 ⁶
	Mixto 2	0	9,8 ± 0,6 ^a	5,943 ± 0,231 ^b	0,029 ± 0,003 ^{de}	2,4 x 10 ⁴
		6	9,1 ± 0,6 ^a	5,235 ± 0,110 ^c	0,079 ± 0,009 ^b	6,9 x 10 ⁵
Ahuyama	Mixto 1	0	6,7 ± 0,3 ^b	6,332 ± 0,094 ^a	0,036 ± 0,003 ^{cde}	3,5 x 10 ⁴
		6	6,3 ± 0,1 ^b	4,697 ± 0,125 ^d	0,141 ± 0,013 ^a	3,5 x 10 ⁷
	Mixto 2	0	6,5 ± 0,4 ^b	6,170 ± 0,106 ^{ab}	0,040 ± 0,002 ^{cd}	3,2 x 10 ⁴
		6	6,1 ± 0,1 ^b	4,714 ± 0,132 ^d	0,135 ± 0,009 ^a	3,0 x 10 ⁷
Espinaca	Mixto 1	0	2,9 ± 0,1 ^c	6,015 ± 0,154 ^b	0,017 ± 0,001 ^e	1,5 x 10 ³
		6	2,8 ± 0,2 ^c	5,331 ± 0,126 ^c	0,026 ± 0,001 ^{de}	4,2 x 10 ⁶
	Mixto 2	0	3,1 ± 0,2 ^c	6,152 ± 0,145 ^{ab}	0,018 ± 0,001 ^e	3,1 x 10 ⁴
		6	3,0 ± 0,1 ^c	5,436 ± 0,147 ^c	0,024 ± 0,003 ^{de}	2,7 x 10 ⁷

Los valores medios ± SD (n=2) que no comparten una letra, en la misma columna, son significativamente diferentes con un nivel de confianza del 95%.

No se presentaron cambios en los sólidos solubles pero se presentó mantenimiento y crecimiento microbiano que se refleja a través de los indicadores de fermentación: un descenso significativo en el pH acompañado de un aumento en la acidez titulable. Sin embargo, no se observan diferencias significativas debidas al empleo de uno u otro cultivo.

Debido a este comportamiento se puede decir que bajo las condiciones de fermentación de las pulpas de hortalizas (remolacha, ahuyama y espinaca) la mayor actividad bacteriana está dada por las cepas más frecuentemente empleadas en la producción de yogurt (*Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii subps. bulgaricus*) y que la actividad de las cepas restantes (*Lactobacillus delbrueckii subps. lactis*, *Lactobacillus acidophilus* y/o *Bifidobacterium lactis*) no produce un cambio importante sobre las variables de respuesta valoradas.

ANEXO F. Análisis sensorial

Para las pruebas descriptivas fue necesario realizar un entrenamiento a los jueces considerando los siguientes atributos:

- Apariencia: este término se refiere a las características que pueden verse a simple vista; es decir, si presenta partículas extrañas, semillas, residuos de cáscaras, manchas blancas o de colores oscuros, mohos o cualquier otra anomalía. Así pues, se valora que la apariencia de la muestra es defectuosa cuando se ven varias de las rarezas mencionadas. En caso de no contener ninguna de ellas y de ser agradable visiblemente, es considerada como adecuada.

- Consistencia: este término se relaciona con la viscosidad y la resistencia a fluir de la muestra. Es considerada líquida si es similar a la densidad de un zumo y densa si es espesa como un pudín o natilla.

- Intensidad de color naranja: este término se refiere a la intensidad de color naranja (color característico de las muestras utilizadas). Así pues, se puntuará según la siguiente escala de colores (Figura F-1), siendo el amarillo (situado a la izquierda) de muy baja intensidad de naranja, y el naranja (situado a la derecha) el de más alta intensidad.



Figura F-1. Escala de color naranja

- Olor característico: este término se refiere a la sensación percibida mediante el olfato. Si se nota la presencia de productos químicos u otros olores desagradables, y no se identifica ningún olor característico de hortalizas y / o frutas conocidas, se considera de olor frutal ausente. Si el olor es claramente característico de alguna hortaliza y / o fruta, y no se percibe la presencia de otros olores extraños, se considera de olor frutal intenso.

- Sabor ácido: este término se refiere a la sensación de acidez que produce la muestra en el paladar. Para poder cuantificar la intensidad de sabor ácido, debe probar en primer lugar, la muestra "prueba ácida", la cual es considerada de intenso sabor ácido. Posteriormente pruebe la pulpa en cuestión y sitúe la línea vertical según crea.

- Sabor dulce: este término se refiere a la sensación de dulzor que produce la muestra en el paladar. Para poder cuantificar la intensidad de sabor, debe probar en primer lugar, la muestra "prueba dulce", la cual es considerada de intenso sabor dulce. Posteriormente pruebe la pulpa en cuestión y sitúe la línea vertical según crea conveniente.

- Sabor característico: este término se refiere a la sensación percibida mediante el gusto. Si se nota la presencia de productos químicos u otros sabores desagradables, y no se identifica ningún sabor característico de hortalizas y / o frutas conocidas, se considera de sabor característico ausente. Si el sabor es claramente característico de alguna hortaliza y / o fruta, y no se percibe la presencia de otros sabores extraños, se considera de sabor característico intenso.

- Textura: este término hace referencia a la estructura de la muestra que se percibe en la boca. Se considera muy áspero si se detectan grumos, filamentos u otros elementos. Se considera suave si la pulpa es fina, sin presencia de grumos ni filamentos.

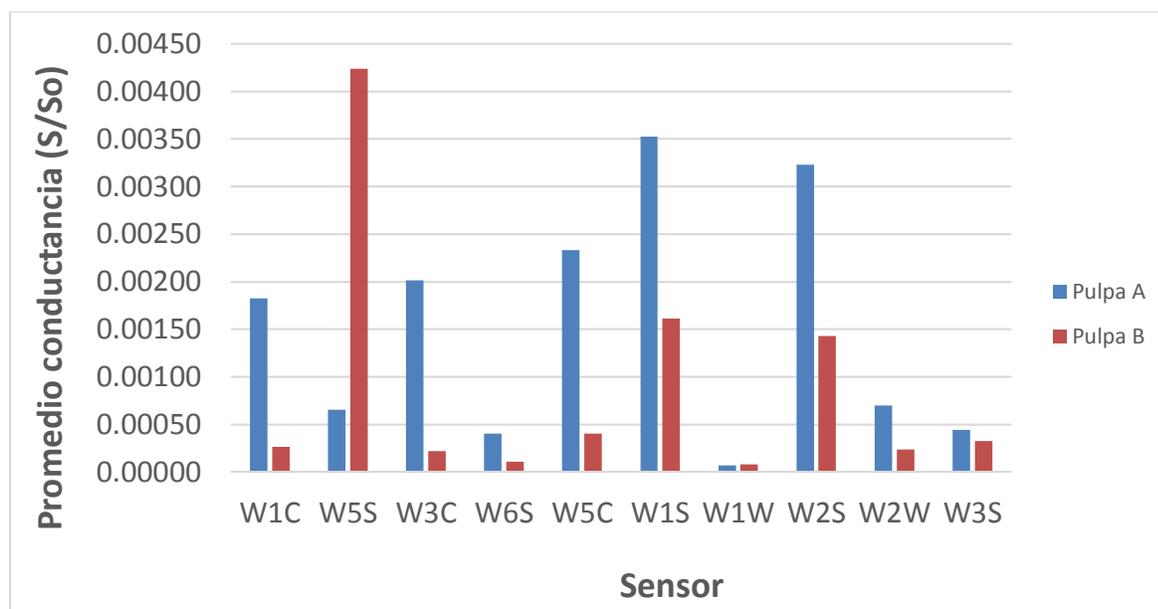
Nº mostra:	
Aparença	
Consistència	
Intensitat color taronja	
Olor característic	
Sabor àcid	
Sabor dolç	
Sabor característic	
Textura	

ANEXO G. Resultados exploratorios con nariz electrónica

De acuerdo con los resultados obtenidos para la evaluación sensorial empleando el panel de panelistas y el panel de expertos de las mezclas amarillas fermentadas y sin fermentar, se observaron diferencias en cuanto a la detección de compuestos específicos relacionados especialmente con el aroma de la muestra.

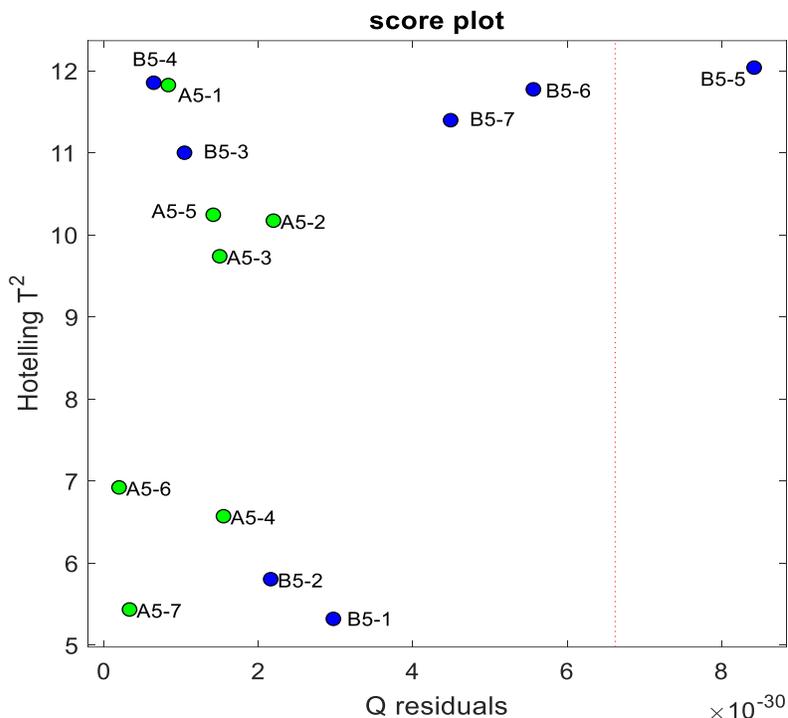
Se consideró entonces el empleo de la nariz electrónica como una técnica instrumental que ayudara a la detección de las diferencias. Se empleó una nariz electrónica portátil comercial Airsense Analytics GmbH PEN3 (Schwerin, Alemania), compuesto por diez sensores de óxidos metálicos (MOS). La muestra fue de 3g y se emplearon viales de 20mL y se realizó por duplicado (A y B). Los resultados se presentan a continuación.

En esta gráfica se presentan los promedios de las respuestas de los sensores para las pulpas A y B, observándose las intensidades para cada producto.



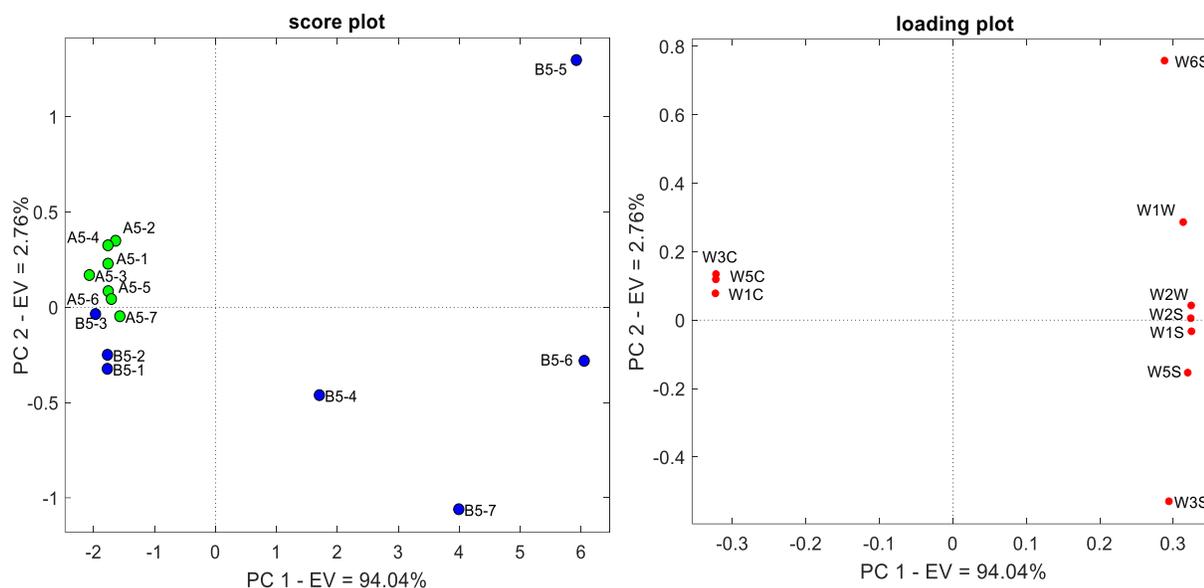
El análisis de los residuos Hotelling's T2 y Q residuals muestra que en general las muestras tienen un comportamiento uniforme, sin la presencia de outliers. No obstante,

se observa la presencia de un dato anómalo (B5-5), el cual, a partir del gráfico de score plot se puede observar que está ubicado en un cuadrante diferente a las muestras de la pulpa B a tiempos similares de tratamiento. Esto puede indicar que el análisis realizado para esta muestra puede tener un error experimental alto.



El análisis de score plot y loading plot (gráficos siguientes) muestra que la pulpa A tiene una varianza intraclase reducida en comparación a la pulpa B. Evidentemente, la ubicación de los resultados de las pulpas A y B en cuadrantes diferentes permite inferir la diferencia en el perfil aromático entre ambos productos. Mientras que para la pulpa A no parece haber diferencias en el tiempo para el perfil aromático (considerando que todos los puntos se ubican en el mismo cuadrante), sí aparenta haber diferencias en el perfil para la pulpa B con a lo largo del tiempo.

La evaluación de la información con respecto al loading plot permite inferir que los sensores que más influencia tienen para la pulpa A son W3C, W5C y W1C que identifican: compuestos aromáticos (W1C y W3C), compuestos aromáticos y alifáticos (W5C). Entre tanto, para la pulpa B, los tres tiempos iniciales (1, 2 y 3) son descritos por el mismo conjunto de sensores que para la pulpa A, mientras que los tiempos posteriores (4 al 7, descartando el tiempo 5 por lo mencionado anteriormente) son descritos por los sensores W1S, W3S y W5S que corresponden con: hidrocarburos de cadena corta (W1S), compuestos alifáticos de cadena corta (W3S) y compuestos nitrogenados (W5S).



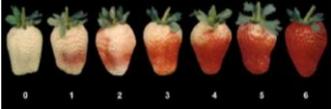
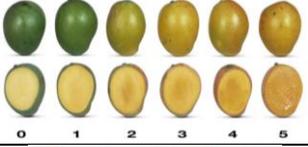
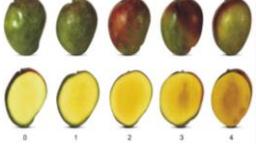
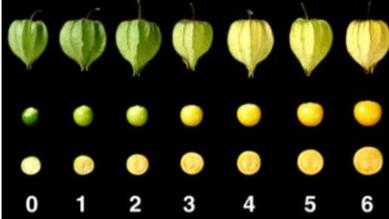
Dados estos resultados y teniendo en cuenta la amplia variabilidad entre las muestras A y B, debe realizarse más ensayos, los cuales pueden complementarse con cromatografía de gases para identificar aquellos compuestos responsables en las diferencias encontradas por el panel de expertos.

Estos análisis podrían contribuir a identificar compuestos producidos por el metabolismo bacteriano durante la fermentación láctica.

ANEXO H. Escala de color normas NTC

Las normas técnicas colombianas consultadas para la determinación de las características de calidad, contemplan escalas de color específicas para las frutas frescas de acuerdo con su grado de maduración, las cuales se recopilan en la Tabla I-1.

Tabla I-1. Guía de color para las frutas frescas de acuerdo con su estado de madurez.

Fruta	Norma técnica	Guía del color
Mora	NTC 4106 (1997)	
Fresa	NTC 4103 (1997)	
Mango	NTC 1266 (1994)	
	NTC 5210 (2003)	
Uchuva	NTC 4580 (1999)	
Lulo	NTC 5093 (2002)	