

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Colegio de Ciencias e Ingeniería

**Estudio del Efecto del Eritritol y Glicerol sobre la Estabilidad Térmica de la Proteína
del Suero Dulce de Queso Fresco y la Aceptación de los Consumidores**

Santiago Daniel Puente Moncayo

Tesis de grado presentada como requisito para la obtención del título en Ingeniero en
Alimentos

Quito, Enero de 2014

Universidad San Francisco de Quito

Colegio de Ciencias e Ingeniería

HOJA DE APROBACION DE TESIS

**Estudio del Efecto del Eritritol y Glicerol sobre la Estabilidad Térmica de la Proteína
del Suero Dulce de Queso Fresco y la Aceptación de los Consumidores**

Santiago Daniel Puente Moncayo

Lucía Ramírez, Ph.D.
Directora de Tesis y Miembro
del Comité de Tesis

Javier Garrido, MSc.
Miembro del Comité de Tesis

Stalin Santacruz, Ph.D.
Miembro del Comité de Tesis

Javier Carvajal Ph.D.
Miembro del Comité de Tesis

Ximena Córdova Ph.D.
Decana de la Escuela de Ingeniería
Colegio de Ciencias e Ingeniería

Quito, Enero de 2014

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído la Política de Propiedad Intelectual de la Universidad San Francisco de Quito y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo de investigación quedan sujetos a lo dispuesto en la Política.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo de investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma:

Nombre: Santiago Daniel Puente Moncayo

C. I.: 1716420169

Fecha: Quito, Enero de 2014

Resumen

La producción de queso deja una gran cantidad de suero de leche como subproducto, y debido a su calidad nutricional, podría ser utilizado en la elaboración de bebidas; sin embargo presenta un problema de desnaturalización, agregación y precipitación de la proteína, cuando es sometido a tratamientos térmicos superiores a 60°C. Este estudio tuvo como objetivos analizar la estabilización térmica de la proteína del suero de leche, agregando glicerol y eritritol; además de la factibilidad de su uso industrial, mediante pruebas sensoriales con consumidores. Las concentraciones de glicerol y eritritol fueron, 5%, 10%, 15% y 2%, 4%, 8% respectivamente, y las variables de respuesta, turbidez (método nefelométrico) y porcentaje de material insolubilizado (método de filtración); se utilizó un *Diseño Completamente al Azar* (DCA) con arreglo factorial aumentado 3^2+2 (2 factores con 3 niveles cada uno y 2 blancos de comparación). Chocolate y menta fueron adicionados para conferir sabor a la bebida en concentraciones de 4%, 6%, 8% y 0,01%, 0,02%, 0,03% respectivamente, siendo las variables de respuesta, viscosidad (método Brookfield) y cantidad de grasa (método de Gerber); se utilizó un DCA con arreglo factorial 3^2 . Tres prototipos resultaron ser los mejores y fueron evaluados sensorialmente utilizando pruebas de preferencia (para determinar las mejores concentraciones) y pruebas hedónicas (para determinar la factibilidad del uso de los estabilizantes). Los resultados del primer estudio determinaron que el mejor tratamiento presentaba 15% glicerol y 8% eritritol, y los tratamientos evaluados sensorialmente fueron aquellos con 6% de chocolate y 0,01%, 0,02% y 0,03% de menta; el estudio sensorial determinó que las concentraciones de los estabilizantes utilizados dejaron regusto en la percepción de los consumidores, indicando que en estas concentraciones no fueron compatibles con el desarrollo de una bebida comercial.

Palabras Clave

Suero de Leche, β -lactoglobulina, proteínas séricas

Abstract

The cheese production leads to a vast amount of whey as a byproduct, this byproduct due to its nutritive qualities could be used in a whey beverage formulation, but the whey protein suffers a denaturalization, aggregation and precipitation when it is subject of a heat treatment. This study had as objective to analyze the heat stability of whey protein adding glycerol and erythritol, as well as the feasibility of its use in the industry, proving it with sensory studies. The concentrations of glycerol and erythritol were 5%, 10%, 15% and 2%, 4%, 8% respectively, the response variables were, turbidity (nephelometric method) and percentage of insolubilized material (filtration method); a completely randomized design was used in both studies (CRD), in the first one a CRD with factorial arrangement 3^2+2 . Chocolate and mint were added to impart flavor, in concentrations of 4%, 6%, 8% and 0,01%, 0,02%, 0,03% respectively, using as response variables, viscosity (Brookfield method) and fat content (Gerber method). Three prototypes were the bests and were evaluated in the sensory study, using preference tests and acceptance tests. The results of the first study determined that the best treatment was the one with 15% of glycerol and 8% of erythritol, the sensory study determined that the concentrations of both stabilizers were rejected by the consumer, suggesting that these stabilizers were not compatible industrially.

Key Words

Whey, β -lactoglobulin, serum proteins.

Tabla de Contenido

1	Introducción	8
2	Objetivos	12
2.1	Objetivo General	12
2.2	Objetivo Específico	13
3	Justificación	13
4	Materiales y Métodos	15
4.1	Diseño experimental	15
4.1.1	Diseño Experimental 1	15
4.1.2	Diseño Experimental 2	26
5	Análisis sensorial	38
5.1	Estudio de preferencia	38
5.1.1	Resultados y discusión	39
5.2	Estudio de aceptación	45
5.2.1	Nivel de agrado	46
5.2.2	Grupo focal.....	48
5.3	Discusión del estudio de aceptación	51
6	Conclusiones	51
7	Recomendaciones	52
8	Bibliografía	53
9	Anexos	60

1 Introducción

El suero de leche proveniente de la producción de queso es el principal subproducto, no solo dentro de la industria láctica (Bhavsagar et al., 2010); sino también en general de la industria de alimentos (Magalhães et al., 2010). Este subproducto es generado en una relación de 1:9 (por cada kg de queso producido se generan 9 L de suero), que es desechado casi en su totalidad, ya sea en el sistema de desagüe o bien en corrientes fluviales sin un tratamiento previo (por costos), generándose problemas de contaminación (González-Martínez et al., 2002; Beloso-Morales y Hernández-Sánchez, 2003; Miranda, 2007; Cuellas, 2008; Smithers, 2008). La contaminación se debe a que la proteína del suero de leche tiene una alta demanda biológica de oxígeno, disminuyendo la cantidad disponible de este gas en el agua. El porcentaje que no es desechado ha sido considerado únicamente como ingrediente en formulaciones o alimento para animales (Beloso-Morales y Hernández-Sánchez, 2003). Sin embargo, la proteína del suero posee varias características deseadas, tanto nutricionales, como funcionales y sensoriales, por lo que la proteína aislada o concentrada ha ganado popularidad como un ingrediente común en la producción de bebidas (Beecher et al., 2008).

Dentro de las características nutricionales, el suero contiene alrededor del 50% de los sólidos de la leche, por lo tanto cuenta con un 6-7% de sólidos totales (Chauhan et al., 2010), dentro de este porcentaje se encuentra la totalidad de las proteínas séricas (20% en base seca) como alfa lactoalbúmina, beta lactoglobulina, glicomacropéptidos, lactoferrina e inmunoglobulinas (Anil et al., 2011), casi toda la lactosa, así como carbohidratos de alto índice glicémico, minerales (electrolitos) (Gerder, 2007) y vitaminas hidro y liposolubles (Atra et al., 2005; Bhavsagar et al., 2010).

El alto valor nutricional de las proteínas séricas se debe a la presencia de todos los aminoácidos, tanto esenciales como no esenciales, además del perfil de aminoácidos; según algunos autores, la cantidad y la relación de estos se encuentran en la relación adecuada que el cuerpo necesita para mantenerse en homeostasis (Diary Foods, 2005).

Las proteínas del suero ayudan a los atletas con el metabolismo muscular, experimentando menor dolor (Millard-Stafford et al., 2005) y generando una síntesis muscular neta positiva después de realizar ejercicios de resistencia (Borsheim et al., 2004); esto se debe a su alto contenido de aminoácidos de cadena ramificada (BCAA's: Leucina, Isoleucina y Valina) con concentraciones entre 20-23g/100g de proteína, que confiere protección contra la pérdida de tejido muscular ayudando en su síntesis (Ha y Zemel, 2003; Layman y Baum, 2004; Severin y Xia, 2005; Tipton et al., 2007; Anil et al., 2011). Una de las razones por las cuales este tipo de aminoácidos (BCAA's) ayuda a la protección muscular, es debido a que son los únicos capaces de producir glucosa, siendo una fuente de energía durante el esfuerzo físico (Diary Foods, 2005); otra forma por la cual se previene la pérdida muscular, es debido a los carbohidratos de alto índice glicémico, que al ser la principal fuente de energía durante el ejercicio, el cuerpo no utiliza aminoácidos, los cuales pasan a la síntesis proteica dentro de las células (Gerder, 2007).

Con respecto a la síntesis neta de proteína muscular, los estudios demuestran que entrenamientos de resistencia generan síntesis de proteína; sin embargo, en balance neto de proteína (diferencia entre síntesis muscular y descomposición del músculo) permanece negativo, siempre y cuando no se ingieran cantidades apropiadas de aminoácidos en las relaciones adecuadas; la ingesta de proteína de suero de leche al demostrar un perfil de aminoácidos apropiada (aminoácidos de cadena ramificada), permite que el balance neto de proteína permanezca positivo durante entrenamiento de deportistas (Tang et al., 2007).

Las proteínas séricas, no solo cuentan con un alto valor nutricional; sino también proveen beneficios a la salud como promover la saciedad y mejorar el control glicémico (Layman, 2003; Layman y Baum, 2004). Estudios realizados en los Estados Unidos, demostraron que el consumo de proteína de suero de leche, disminuye los niveles y la frecuencia de hambre, aumentando la concentración de hormonas que promueven la saciedad, en el plasma sanguíneo (péptido similar al glucagón-1 y colecistoquinina) (Bowen et al., 2006a; Bowen et al., 2006b; Blom, et al., 2006) y también a que la proteína junto con la lactosa suprimen la secreción de la grelina (hormona responsable de la sensación de hambre) hasta 4 horas después del consumo de proteínas séricas (Bowen et al., 2006a; Bowen et al., 2006b). Además, la grelina tiene una secreción inversa a la insulina (Saad et al., 2002; Flanagan et al., 2003; Cummings et al., 2004); es decir que mientras la secreción de la grelina está suprimida, se aumenta la secreción de la insulina, esta propiedad ayudaría a personas diabéticas, o personas con una alta actividad física.

Otros beneficios son: ayuda con problemas de presión alta (Diary Foods, 2005), prevención del cáncer (Legarová y Kourimská, 2010; Minhas y Sood , 2011) e incluso es sugerido, que algunos componentes bio-activos confieren protección contra infecciones bacterianas y virales (Diary Foods, 2005; Minhas y Sood , 2011); ayudan al sistema inmune, poseen actividad antioxidante teniendo efecto en enfermedades cardiovasculares (Minhas y Sood , 2011), tienen efecto sobre la baja de colesterol, incrementan niveles de serotonina en el cerebro, contribuyen al funcionamiento del hígado y a la disminución de presión sanguínea en personas hipertensas (Minhas y Sood , 2011).

Por último, están las características funcionales y sensoriales que el suero de leche confiere a la bebida; la proteína del lactosuero ayuda como emulsificante (Diary Foods, 2005).

A pesar de los beneficios del suero de leche, el lacto suero y, específicamente, sus proteínas presentan una baja estabilidad térmica ya que a una temperatura cercana a la que se usa para pasteurizar bebidas (88°C), las proteínas comienzan a desnaturalizarse, bajando su solubilidad generando agregación proteica, formando un coagulado blanco de apariencia turbia que precipita (Etzel, 2004); este fenómeno aumenta conforme el pH se acerca al punto isoeléctrico ($pI=4,6$). Las bebidas actuales, ya sean estas a base de suero de leche o adicionadas proteína aislada o concentrada de suero, son elaborados a un pH menor a 3,5 para mantener la proteína solubilizada y obtener una bebida clara (en el caso de ser una bebida con adición de proteína) (Beecher et al., 2008).

Elaborar este tipo de bebidas a un pH ácido tiene ciertas ventajas frente a pH neutros, ya que promueve una bebida clara, reduce el requerimiento de tratamientos térmicos a temperaturas muy altas y alarga la vida útil del producto (Beecher et al., 2008); sin embargo, es necesario mayor cantidad de azúcar para mantener un adecuado equilibrio entre dulzor y acidez, con el fin de evitar una sensación astringente alta (Etzel, 2004).

Estudios realizados con paneles sensoriales demostraron que la percepción de la astringencia era 7,3 veces mayor en una bebida a un pH 3,4 comparada con una de pH 6,8 (Beecher et al., 2008).

La precipitación proteica puede impedirse mediante la prevención de la desnaturalización o la agregación de la proteína desnaturalizada; la adición de glicerol y eritritol, ayudan a evitar la precipitación de la proteína mediante ambos mecanismos (Etzel, 2004; Caitlin et al., 2010).

Tanto los polioles (eritritol en este caso), y el glicerol, al tener grupos funcionales hidroxilo, ayudan en la bebida, mediante la interacción favorable de éstos con las partes hidrófobas de las moléculas de las proteínas, como la β -lactoglobulina (BLG), que se

expone durante el tratamiento térmico (Romero et al., 2007), ayudando así a disminuir la pérdida de solubilidad.

Los polioles actúan como co-solventes, ayudando en la estabilización de la proteína, lo que se cree es debido a una repulsión estérica, en la que el eritritol ayuda protegiendo a los estados desnaturalizados de la proteína, evitando una interacción entre si e impidiendo una agregación proteica (McClements, 2002). Las cadenas secundarias de las proteínas tienen una interacción mayor con los polioles que entre proteína-proteína (Caitlin et al., 2010), por lo que disminuye la precipitación proteica; adicionalmente, la disminución en la agregación, también se atribuye al incremento en la tensión superficial, lo que estabiliza el estado nativo de la proteína (Arakawa y Timasheff, 1982).

De igual forma las moléculas de glicerol estabilizan el estado nativo de la proteína, además interactúan con los grupos hidrofóbicos de la superficie de la proteína, por lo que existe una unión entre el glicerol y la proteína en estado nativo, lo que disminuye la exposición de grupos no polares que inciden en las reacciones de agregación proteica; por lo tanto, el glicerol previene la desnaturalización proteica y su precipitación (McClements, 2002). Otro de los mecanismos sugeridos por McClements (2002) es mediante el aumento de la viscosidad, lo que tiene como resultado una menor interacción proteína-proteína evitando la agregación proteica.

2 Objetivos

2.1 Objetivo General

Evaluar la estabilidad térmica de la proteína del suero de leche mediante la adición de glicerol y eritritol.

2.2 Objetivo Específico

- Aumentar la estabilidad térmica de la proteína del suero mediante la adición de glicerol y eritritol.
- Estudiar el efecto de estos dos compuestos sobre la solubilidad de las proteínas séricas.
- Estudiar el efecto que tiene la adición tanto del glicerol como del eritritol en la agregación proteica.
- Determinar el nivel de efectividad relacionada al grado de disminución de la precipitación proteica expresada como turbidez.
- Estudiar el impacto de estos estabilizadores, sobre el nivel de agrado y la aceptación por parte de los consumidores.

3 Justificación

Gupta y Mathur (1989) enfatizan el uso del suero de leche para la elaboración de bebidas, ya que no solo contiene un gran valor nutritivo y es un alimento funcional (Caitlin et al., 2010), sino que al ser un subproducto de desecho en la industria quesera, su costo es bajo y es una materia prima abundante debido a la gran producción de queso existente; no existen datos de la producción en el Ecuador; sin embargo, en México se produce 135 millones de kilogramos de queso anualmente, lo que deja alrededor de 675 millones de litros de suero (Belloso-Morales y Hernández-Sánchez, 2003).

Adicionalmente, puede ser una opción viable para aumentar las ganancias dentro de la industria láctea y una posible solución al problema ambiental causado por la falta de utilización de este subproducto (Bhavsagar et al., 2010). Por otro lado, en países desarrollados, ya se comercializan bebidas a base de suero de leche ácido, con una alta aceptación por parte de los consumidores. Por ejemplo en Suiza y en Holanda existe una

bebida carbonatada llamada “Revella” y en Estados Unidos una bebida a base de Chocolate “Thumps up” (Hoogstraten, 1987).

Se ha trabajado ampliamente en alternativas de producción para aprovechar la alta cantidad de suero de leche generado, como la producción de alcohol potable mediante la fermentación con microorganismos (Guimarães et al., 2012), producción de bebidas destiladas (Dragone et al., 2009), bebidas similares al kéfir (Magalhães et al., 2010); a pesar que se ha demostrado un potencial para su industrialización, los productores de queso considerados en su mayoría medianos o pequeños, no cuentan con los recursos necesarios para montar diferentes plantas procesadoras (Monsalve y González, 2005).

Estudios de factibilidad que se han realizado, determinaron que el desarrollo de una bebida láctea, es la mejor alternativa, teniendo un alto nivel de aprovechamiento, así como tiempos y costos de producción bajos; estos estudios también demostraron una alta reducción de la contaminación en ríos, producida por el suero de leche, y una aceptación prometedora (Cuellas y Wagner, 2010). En general se ha dado un aumento en el índice de consumo de bebidas lácteas (yogurt, bebidas lácteas fermentadas y bebidas “milk-like”), siendo las bebidas a base de proteínas séricas un segmento creciente (Legarová y Kourimská, 2010).

En estudios realizados por Caitlin et al. (2010) la adición de glicerol (20% v/v) permitió obtener una bebida clara, reduciendo significativamente ($p < 0,05$) la agregación proteica (relacionada con la turbidez en este tipo de bebidas); de igual manera, con la adición, por separado, del eritritol (100g/L) se demostró una disminución significativa ($p < 0,05$) del 62% de la turbidez, siendo el azúcar alcohol que mayor eficiencia obtuvo dentro de todos los probados.

Los polioles no solo reducen la turbidez producida por la precipitación proteica, sino también el aporte calórico (0,2 Kcal/gramo) proporcionando un dulzor similar a los azúcares (Damodaran y Parkin, 2007).

El suero de leche presenta palatabilidad pobre y sensación muy líquida, además su sabor no es agradable; lo que los consumidores buscan en una bebida láctea es una sensación cremosa y un sabor atractivo, que puede ser obtenido con la adición de chocolate en barra (91%) (Legarová y Kourimská, 2010). El sabor a menta enmascara el sabor alcoholado tanto del glicerol como del eritritol.

4 Materiales y Métodos

4.1 Diseño experimental

Se realizaron dos diseños experimentales: el primero evaluó el efecto estabilizador, de la adición tanto del glicerol y eritritol, sobre la estabilidad térmica de la proteína del suero de leche; el segundo el efecto de la adición de ambos estabilizantes sobre la percepción de los consumidores.

4.1.1 Diseño Experimental 1

Con el primer diseño experimental se determinó qué combinación de estabilizantes fue la más efectiva para eliminar o evitar la agregación proteica.

Se utilizó un *Diseño Completamente al Azar* (DCA) con arreglo factorial aumentado 3^2+2 , es decir 2 factores con 3 niveles cada uno y 2 blancos de comparación, con 3 repeticiones obteniéndose 11 tratamientos y 33 unidades experimentales.

Los factores con sus respectivos niveles fueron:

- Glicerol (Factor A): 5% - 10% - 15%

- Eritritol (Factor B): 2% - 4% - 8%
- Blanco (STT/CTT): blanco sin tratamiento térmico y blanco con tratamiento térmico respectivamente.

Estudios realizados por Caitlin et al. (2010) demostraron que con 20 % v/v de glicerol se obtenía una bebida clara (sin agregación proteica perceptible); se utilizaron niveles inferiores debido a que el glicerol presenta un contenido calórico alto y también se adicionó eritritol como segundo estabilizante.

Las concentraciones de eritritol fueron determinadas en base a estudios que sugieren que en éstas cantidades, confiere características refrescantes en una bebida (Cock y Hubertus, 2004). Por otro lado, un estudio realizado por Caitlin et al. (2010), demostró que con 10% m/v se logró reducir la turbidez en un 60%; se utilizaron niveles inferiores debido a que junto con eritritol se adicionó glicerol.

De acuerdo al Codex Alimentarius (CODEX STAN 192-1995), tanto el glicerol como el eritritol no tienen contraindicaciones en las dosis utilizadas.

Se utilizó dos blancos con el fin de determinar cuál de los 9 tratamientos fue el más cercano tanto al STT como al CTT. El tratamiento más cercano al CTT sería el de menor efecto estabilizante, mientras que el más cercano al STT sería el mejor tratamiento para prevenir la agregación proteica.

Las variables de respuesta fueron:

- **Turbidez:** relacionada directamente con el aumento en la agregación proteica (Caitlin et al., 2010).

Fue determinado de acuerdo al método descrito en la Norma INEN 971 (AGUA POTABLE. DETERMINACIÓN DE LA TURBIEDAD. METODO NEFELOMETRICO).

Especificación: Que los tratamientos tengan una turbidez igual o cercana al Blanco STT.

- **Porcentaje de material insolubilizado:** relacionado con la insolubilización y posterior precipitación de la proteína (Caitlin et al., 2010).

Fue determinado de acuerdo al método descrito en la Norma INEN 1635 (MIEL DE ABEJAS. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE SÓLIDOS INSOLUBLES).

Especificación: Que los tratamientos tengan un porcentaje de material insolubilizado igual o cercano al Blanco STT.

Preparación

1. Se mezcló el eritritol, glicerol y el suero de leche por 1 minuto (hasta completa homogenización) en una licuadora Oster, en la segunda velocidad.
2. La mezcla fue pasteurizada.
3. El proceso térmico consistió en elevar la temperatura de la mezcla hasta alcanzar los 88° C, manteniéndola por 3 minutos.
4. Terminado el proceso térmico, se envasó en caliente y se enfrió hasta la temperatura de refrigeración (entre 7-4 °C).

Prototipos

Los 11 tratamientos, con sus respectivos niveles son presentados en la Tabla 1

Tabla 1: Tratamientos

Tratamiento	Glicerol (g/100g)	Eritritol (g/100g)
T1	5	2
T2	5	4
T3	5	8
T4	10	2
T5	10	4
T6	10	8
T7	15	2
T8	15	4
T9	15	8
TB CTT	0	0
TB STT	0	0

TB CTT= Blanco con tratamiento térmico

TB STT= Blanco sin tratamiento térmico

Resultados

Turbidez

Ho: No existió diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos en cuanto a la turbidez.

Ha: Existió una diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos en cuanto a la turbidez.

En la Tabla 2 se presenta el análisis de varianza (ANOVA) de la turbidez de los tratamientos.

Tabla 2: Análisis de varianza (ANOVA) de la turbidez de los tratamientos

FV	G.L	SC	CM	Fc	Ft
Total	32	2303674,97	71989,84		
Tratamientos	10	2301154,30	230115,43	2008,41 *	2,30
Glicerol (A)	2	1254316,52	627158,26	5473,74 *	3,05
Eritritol (B)	2	184870,30	92435,15	806,76 *	3,05
Interacción A*B	4	38334,81	9583,70	83,65 *	2,82
TB CTT vs Resto	1	581112,44	581112,44	5071,86 *	4,30
TB STT vs Factorial	1	242520,24	242520,24	2116,68 *	4,30
EE	22	2520,67	114,58		

* significativo al 5% de probabilidad por la prueba F

CV= 0,7442

En el análisis de varianza (Tabla 2) se observa que existió una diferencia estadística cuando se comparó el blanco con tratamiento térmico contra los demás tratamientos y el blanco sin tratamiento térmico contra los tratamientos factoriales (T1:T9), lo que demostró un efecto estabilizador con la adición tanto de glicerol como de eritritol.

También existió diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos, que evidenció que el efecto estabilizador depende de las concentraciones utilizadas.

Se observó una diferencia entre ambos estabilizadores utilizados, el glicerol confiere una estabilidad térmica mayor que el eritritol, demostrado por la diferencia entre el Fc y Ft, que para el glicerol es mayor que para el eritritol; esto concuerda con el estudio conducido por Caitlin et al. (2010), que demostró que una adición del 20% de glicerol daba como resultado una bebida clara, mientras que al solo agregar eritritol, la turbidez disminuía alrededor de 60%, mas no se obtenía una bebida clara.

Se obtuvo un CV de 0,744%, estando dentro del permitido para un experimento en laboratorio (5%), indicando que los datos obtenidos son aceptables y confiables (Sánchez-Otero, 2009).

En la Tabla 3 se presenta la turbidez de los tratamientos.

Tabla 3: Turbidez de los tratamientos.

Tratamientos	Turbidez (NTU)
TB CTT	1750,00 (a)
T1	1737,67 (a)
T2	1703,33 (a)
T3	1629,33 (b)
T4	1574,00 (c)
T5	1535,00 (c, d)
T6	1371,00 (e)
T7	1330,67 (e)
T8	1136,33 (f)
T9	1035,33 (g)
TB STT	1018,67 (g)

Medias seguidas por las mismas letras no presentan diferencia estadística al 5% de probabilidad por la prueba Scheffé

Los tratamientos T1, T2 fueron estadísticamente iguales al TB CTT, indicando que los estabilizantes en las cantidades utilizadas en estos tratamientos no tuvieron efecto estadísticamente perceptible.

El mejor tratamiento fue el T9, ya que no presentó una diferencia estadísticamente significativa frente al testigo TB STT, por lo tanto la proteína del suero de leche si bien sufrió un cierto grado de agregación, este no fue perceptible.

La turbidez de los tratamientos mostró que existió una estabilización, de la proteína frente al tratamiento térmico, ya que conforme aumentaba la cantidad de glicerol y eritritol la

turbidez disminuía, lo que coincide con otros estudios en los que añadieron ambos compuestos por separado (Caitlin et al., 2009; Caitlin et al., 2010).

Arahawa y Timasheff (1982) sugirieron que los polioles tienen un efecto estabilizador y previenen la agregación proteica en albúminas séricas bobinas y β -lactoglobulina, también McClements (2002) afirmó la capacidad estabilizante de los polioles, actuando como co-solventes del estado desnaturalizado de la proteína dentro de una bebida, lo que fue consistente con los resultados obtenidos, menor turbidez en aquellos tratamientos con una mayor concentración de eritritol (poliol).

McClements (2002) propuso que el glicerol estabiliza a la proteína en su estado nativo, generando una interacción proteína-glicerol en lugar de proteína-proteína. Baier et al. (2004) estudiando albuminas séricas, observaron que la turbidez era menor en presencia de glicerol comparando con tratamientos sin éste, esto concuerda con los resultados obtenidos, conforme la concentración de glicerol aumentó en los diferentes tratamientos, estos presentaron una menor turbidez.

Material insolubilizado

Cuando existe agregación proteica, se genera un precipitado peptídico (Caitlin et al., 2009; Caitlin et al., 2010). La medición de la cantidad de material insolubilizado indicaría, al igual que la turbidez la efectividad de ambos estabilizantes para mantener solubilizada la proteína.

Ho: No existió diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos en cuanto a la cantidad de material insolubilizado.

Ha: Existió diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos en cuanto a la cantidad de material insolubilizado.

En la Tabla 4 se presenta el análisis de varianza (ANOVA) del porcentaje de material insolubilizado de los tratamientos.

Tabla 4: Análisis de varianza (ANOVA) del porcentaje de material insolubilizado de los tratamientos

FV	G.L	SC	CM	Fc	Ft
Total	32	25,88	0,81		
Tratamientos	10	25,84	2,58	1602,88 *	2,30
Glicerol (A)	2	15,52	7,76	4813,22 *	3,05
Eritritol (B)	2	1,39	0,69	429,78 *	3,05
Interacción A*B	4	8,94	2,23	1385,71 *	2,82
TB CTT vs Resto	1	4,43	4,43	2747,47 *	4,30
TB STT vs Factorial	1	4,41	4,41	2734,74 *	4,30
EE	22	0,04	0,00		

* significativo al 5% de probabilidad por la prueba F

CV= 3,3833

En el análisis de varianza se observa que existió una diferencia estadísticamente significativa al comparar el blanco con tratamiento térmico contra los demás tratamientos y el blanco sin tratamiento térmico contra los tratamientos factoriales (T1:T9), indicando que existió un efecto estabilizador con la adición tanto de glicerol como de eritritol; los mismo resultados fueron observados en el análisis de los datos obtenidos en la turbidez.

También existió diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos, observándose que el efecto estabilizador fue diferente con las cantidades adicionadas de glicerol y eritritol; lo mismo fue evidenciado en otros estudios, en los cuales la proteína de suero formaba un precipitado menor conforme la concentración de glicerol y eritritol aumentaba (Jacobs LJ, 1987; Caitlin et al., 2009; Caitlin et al., 2010).

Estudios realizados por Reilkin et al. (1992) y Albis (2009), utilizando polioles, dieron como resultado un menor grado de desnaturalización de la β -lactoglobulina y α -lactoalbúmina, traducido en una menor cantidad de proteína insoluble, esto sustentó los resultados obtenidos, dando un menor grado de agregación al utilizar eritritol.

Se observó una diferencia entre ambos estabilizadores utilizados, es decir que el glicerol confirió una estabilidad térmica mayor que el eritritol, demostrado por la diferencia entre el Fc y Ft, que para el glicerol es mayor que para el eritritol; esto concuerda con el estudio conducido por Caitlin et al. (2009, 2010), que demostró que la adición del 20% de glicerol permitía obtener una bebida clara, mientras que al solo agregar eritritol la turbidez solo disminuía en un 60%, mas no se obtenía una bebida clara.

Se obtuvo un CV de 3,38 %, que está dentro del permitido para un experimento en laboratorio (5%), indicando que los datos obtenidos fueron aceptables y confiables (Sánchez-Otero, 2009).

La Tabla 5 muestra el porcentaje de material insolubilizado de los tratamientos

Tabla 5: Porcentaje de material insolubilizado de los tratamientos.

Tratamientos	% material insolubilizado
TB CTT	2,4526 (a)
T1	2,3499 (b)
T2	2,1251 (c)
T3	1,7328 (d)
T4	1,4953 (e)
T5	1,3020 (f)
T6	0,9213 (g)
T7	0,5051 (h)
T8	0,1101 (i)
T9	0,0316 (j)
TB STT	0,0282 (k)

Medias seguidas por las mismas letras no presentan diferencia estadística al 5% de probabilidad por la prueba Scheffé

Todos los tratamientos fueron estadísticamente diferentes; es decir, que el efecto estabilizante tuvo relación con la cantidad añadida de estabilizante.

El T9 fue el tratamiento más cercano al TB STT; pero diferente estadísticamente, siendo el mejor tratamiento generando la menor cantidad de material insolubilizado; la proteína se desnaturizó durante el tratamiento térmico pero permaneció estable en suspensión coloidal por causa del glicerol y eritritol debido a que la proteína desnaturizada no tiene el mismo tamaño de partícula que la proteína no desnaturizada.

Arakawa y Timasheff (1982), McClements (2002), Baier et al. (2004) y Caitlin et al. (2009, 2010) sugirieron que el glicerol y el eritritol no permiten la formación de un

precipitado proteico insoluble (material insolubilizado), ya sea evitando la desnaturalización de las proteínas séricas o mediante la solubilización de la proteína desnaturalizada (Reilkin et al., 1992; Albis, 2009); esto es coherente con los resultados del presente estudio, obteniendo una disminución en la cantidad de material insolubilizado al agregar ambos compuestos.

Al igual que la turbidez, el porcentaje de material insolubilizado, tuvo una tendencia descendente; analizando ambas variables de respuesta, la proteína sufrió una menor agregación y menor insolubilización al momento y posterior al tratamiento térmico (Caitlin et al., 2009; Caitlin et al., 2010).

Considerando tanto la turbidez como el porcentaje de material insolubilizado el tratamiento 9 (15% glicerol 8% eritritol) fue el mejor prototipo, pasando al segundo diseño experimental.

4.1.2 Diseño Experimental 2

En el segundo diseño experimental se evaluó la posibilidad de desarrollar una bebida comercial aceptada por los consumidores.

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con arreglo factorial 3^2 ; es decir 2 factores con 3 niveles cada uno y con 3 repeticiones obteniéndose 9 tratamientos y 27 unidades experimentales.

Los factores con sus respectivos niveles fueron:

- Chocolate (Factor A): 4% - 6% - 8%
- Menta (Factor B): 0,01% - 0,02% - 0,03%

Las concentraciones de chocolate utilizadas fueron determinadas en base a la sugerencia de Fernando Ortiz (Gerente Técnico de Ecuatoriana de Chocolate, comunicación personal); mientras que las concentraciones de menta inicialmente fueron definidas de acuerdo a la recomendación del fabricante (CRAMER), y posteriormente se corrieron pruebas hedónicas y focus grup.

Las variables de respuesta fueron:

- **Viscosidad:** Fue determinado de acuerdo al método descrito en la Norma Covenin 2181-84 (PULPA DE FRUTA. DETERMINACION DE VISCOSIDAD).
Especificación: Máximo 52 cP; de acuerdo a la viscosidad de una bebida comercial (Nesquik); la especificación es el promedio obtenido del análisis de 25 muestras de 5 lotes diferentes.
- **Contenido de grasa:** Fue determinado de acuerdo al método descrito en la Norma INEN 0012 (LECHE. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE GRASA).
Especificación: Mínimo 3,0%; referencia a la norma colombiana NTC 1419 (PRODUCTOS LÁCTEOS. LECHE LÍQUIDA SABORIZADA).

Preparación de la bebida

1. Se pesó y mezcló los ingredientes en una licuadora Oster en la segunda velocidad por 5 minutos.
2. Paralelamente al mezclado se derritió el chocolate en baño maría.
3. El proceso de mezclado fue:
 - 3.1. Se colocó el suero de leche en la licuadora
 - 3.2. Se adicionó citrato de sodio, sacarosa y eritritol.
 - 3.3. Después, junto con el glicerol se agregó el emulsificante y el chocolate en estado líquido.

3.4. Finalmente fueron adicionados la goma arábica y la esencia de menta.

4. Después del mezclado se homogenizó.

4.1. La bebida caliente fue colocada en el homogenizador (marca Armfield), a 60 °C y con presiones entre 250 a 300 psi.

5. La mezcla homogénea fue pasteurizada (88°C por 3 minutos).

6. Concluido el proceso térmico, se envasó en caliente y se enfrió hasta la temperatura de refrigeración (entre 7-4 °C).

Formulación inicial

La formulación inicial se presenta en la Tabla 6.

Tabla 6: Formulación inicial

Ingrediente	g/100g
Glicerol	15
Eritritol	8
Emulsificante	0,1
Goma Arábica	0,2
Citrato de Sodio	0,2
Sacarosa	1
Chocolate	8
Menta	1,5
Suero de Leche	66

La cantidad de menta adicionada fue de acuerdo a la especificación técnica del fabricante (cantidad recomendada 1,5 g/100g). Sin embargo en estudios preliminares, se determinó

que esta concentración era muy fuerte, por lo que se continuaron haciendo pruebas hedónicas (Tabla 8 y 9) hasta encontrar las concentraciones que los panelistas consideraban agradables. En la Tabla 7 se muestran las cantidades utilizadas en la primera prueba realizada.

Tabla 7 Formulación preliminar.

Formulaciones	Chocolate (g/100g)	Menta (g/100g)
Formulación 1	8	1,5
Formulación 2	8	1,0
Formulación 3	8	0,5

En la Tabla 8 se muestran las cantidades utilizadas en las segunda prueba sensorial.

Tabla 8 Formulación preliminar 2.

Formulaciones	Chocolate (g/100g)	Menta (g/100g)
Formulación 1	8	0,25
Formulación 2	8	0,15
Formulación 3	8	0,10

En la Tabla 9 se muestran las cantidades utilizadas en las tercera prueba preliminar, en la que se determinó que concentración de menta se utilizaría en el diseño experimental.

Tabla 9 Formulación preliminar 3.

Formulaciones	Chocolate (g/100g)	Menta (g/100g)
Formulación 1	8	0,1
Formulación 2	8	0,05
Formulación 3	8	0,02

Los panelistas del estudio preliminar determinaron que la formulación 3 fue la que presentaba la cantidad de menta agradable; utilizándose entonces en el segundo diseño experimental.

Formulación final para el segundo diseño experimental

En la Tabla 10 se muestran las concentraciones de menta que se utilizaron durante el segundo diseño experimental; en vista que los panelistas no mencionaron el contenido de chocolate como un factor para una disminución en el agrado, no se cambiaron los porcentajes establecidos inicialmente del contenido de chocolate

Tabla 10: Concentraciones de menta

Formulaciones	Menta (g/100g)
Formulación 1	0,01
Formulación 2	0,02
Formulación 3	0,03

Prototipos

Los 9 tratamientos, con sus respectivos niveles son presentados en la Tabla 11

Tabla 11: Tratamientos

Tratamiento	Chocolate (g/100g)	Menta (g/100g)
T1	4	0,01
T2	4	0,02
T3	4	0,03
T4	6	0,01
T5	6	0,02
T6	6	0,03
T7	8	0,01
T8	8	0,02
T9	8	0,03

Resultados**Viscosidad**

Ho: No existió diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos con respecto a la viscosidad.

Ha: Existió diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos con respecto a la viscosidad.

En la Tabla 12 se presenta el análisis de varianza (ANOVA) de la viscosidad de los tratamientos.

Tabla 12: Análisis de varianza (ANOVA) de la viscosidad de los tratamientos.

FV	G.L	SC	CM	Fc	Ft
Total	26	39334,07	1512,85		
Tratamientos	8	39271,41	4908,93	1410,01*	2,51
Chocolate (A)	2	39269,41	19634,70	5639,76*	3,55
Menta (B)	2	0,30	0,15	0,04 NS	3,55
Interacción A*B	4	1,70	0,43	0,12 NS	2,93
EE	18	62,67	3,48		

* significativo al 5% de probabilidad por la prueba F; NS no significativo al 5% de probabilidad por la prueba F

CV= 3,00

En el análisis de varianza se observa que existió una diferencia significativa entre los tratamientos. Únicamente el factor A (cantidad de chocolate) tuvo incidencia estadísticamente significativa en la viscosidad de la bebida. Tanto el factor B como la interacción A * B no afectaron a la viscosidad de la bebida, por lo que la cantidad de esencia de menta agregada no cambió esta variable.

Se obtuvo un CV de 3,00%, valor permitido para un experimento en laboratorio (5%), indicando que los datos obtenidos fueron aceptables y confiables (Sánchez-Otero, 2009).

La Tabla 13 presenta la viscosidad de los tratamientos

Tabla 13: Viscosidad de los tratamientos

Tratamientos	Viscosidad (cP)
T9	114,67 (a)
T7	114,33 (a)
T8	113,67 (a)
T5	48,67 (b)
T6	48,33 (b)
T4	48,33 (b)
T3	24,00 (c)
T2	24,00 (c)
T1	23,67 (c)

Medias seguidas por las mismas letras no presentan diferencia estadística al 5% de probabilidad por la prueba Scheffé

Los tratamientos que tuvieron diferencia estadísticamente significativa fueron los que tienen diferente contenido de chocolate (8%, 6% y 4%), pero entre T9:T7 (chocolate 8%) no existió diferencia estadística, lo mismo se evidenció entre los otros rango T6:T4 (chocolate 6%) y T3:T2 (chocolate 4%). Dentro de estos rangos existió diferencia en las cantidades de menta (0,03%, 0,02% y 0,01%) pero no presentaron un cambio significativo sobre la viscosidad. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el análisis de varianza.

La viscosidad cambió conforme aumentó la cantidad de chocolate agregado, esto se debe a que el chocolate utilizado contiene alrededor de 60-65% de materia grasa.

Tomando en cuenta el valor de referencia (52 cP), únicamente los tratamientos T1:T6 cumplieron con esta especificación.

Contenido de grasa

Ho: No existió diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos con respecto al contenido de grasa.

Ha: Existió diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos con respecto al contenido de grasa.

En la Tabla 14 se muestra el análisis de varianza (ANOVA) del contenido de grasa de los tratamientos.

Tabla 14: Análisis de varianza (ANOVA) del contenido de grasa.

FV	G.L	SC	CM	Fc	Ft
Total	26	23,7856	0,9148		
Tratamientos	8	23,4181	2,9273	143,40*	2,51
Chocolate (A)	2	23,4111	11,7055	573,42*	3,55
Menta (B)	2	0,0012	0,0006	0,03 NS	3,55
Interacción A*B	4	0,0059	0,0015	0,07 NS	2,93
EE	18	0,3674	0,0204		

* significativo al 5% de probabilidad de la prueba F; NS no significativo al 5% de probabilidad de la prueba F

CV= 4,00

Según el análisis de varianza existió una diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos. La adición de chocolate fue el factor que generó un cambio estadístico en la cantidad de material graso.

Tanto la cantidad de menta como la interacción entre A*B no influyen en el contenido de grasa de los tratamientos.

Se obtuvo un CV de 4,00%, valor permitido para un experimento en laboratorio (5%), indicando que los datos obtenidos fueron aceptables y confiables (Sánchez-Otero, 2009).

En la Tabla 15 se presenta el contenido de grasa de los tratamientos

Tabla 15: Contenido de grasa de los tratamientos

Tratamientos	Contenido de Grasa (g/ 100 L)
T9	4,7369 (a)
T8	4,7299 (a)
T7	4,7165 (b)
T4	3,5564 (c)
T6	3,5313 (d)
T5	3,5272 (d)
T3	2,4671 (e)
T2	2,4609 (e)
T1	2,4148 (f)

Medidas seguidas por las mismas letras no presentan diferencia estadística al 5% de probabilidad por la prueba Scheffé

Los tratamientos T9 y T8 no presentaron diferencia estadística entre sí. Igualmente los tratamientos T6 y T5 así como T3 y T2, no fueron estadísticamente diferentes entre sí. T7, T4 y T1, presentaron una diferencia de rango con respecto a T9:T8, T6:T5 y T3:T2 (siendo tratamientos con la misma cantidad de chocolate) respectivamente, esta diferenciación probablemente se debe a lo estricto de la prueba utilizada (Scheffé).

De acuerdo a la norma colombiana para una leche saborizada entera, el contenido de grasa, es de mínimo 3%, Por lo tanto los tratamientos T9, T8, T7, T6, T5 y T4 cumplieron esta especificación.

El aumento de la cantidad de chocolate, fue reflejado en un incremento significativo en el porcentaje de grasa; la cantidad de esencia de menta parece que no incidió en el contenido de grasa.

Tabla de ponderación

Para poder determinar qué formulación o formulaciones podrían continuar el estudio sensorial, se utilizó una tabla de ponderación, asignándose el valor de 2 para el contenido de grasa y de 1 para la viscosidad.

El contenido de grasa fue la característica más importante para la toma de la decisión, ya que en este caso, la viscosidad estaba relacionada con el contenido de grasa, además se buscaba obtener una bebida semejante a una bebida láctea achocolatada, y las características de palatabilidad son conferidas por el material graso.

En la Tabla 16 se muestra la ponderación de las variables de respuesta.

Tabla 16: Tabla de ponderación

Tratamiento	Contenido de Grasa	Viscosidad	Total
T1	0	1	1
T2	0	1	1
T3	0	1	1
T4	2	1	3
T5	2	1	3
T6	2	1	3
T7	2	0	2
T8	2	0	2
T9	2	0	2

Los tratamientos con 8 % de chocolate no cumplieron con la viscosidad esperada para la bebida, pero el contenido de grasa estuvo de acuerdo con la normativa utilizada.

Los tratamientos T1, T2 y T3, estuvieron dentro del parámetro de viscosidad, pero no del contenido de grasa; T4, T5 y T6 cumplieron con ambas especificaciones deseadas, por lo que continuaron el estudio sensorial (Tabla 17).

Tabla 17: Prototipos

Tratamiento	Chocolate	Menta
T4	6%	0,01%
T5	6%	0,02%
T6	6%	0,03%

5 Análisis sensorial

Se realizó una prueba de preferencia para determinar cuál de las concentraciones de menta en las tres formulaciones debía seguir con un posterior estudio de aceptación. El análisis estadístico se realizó partiendo de una prueba de una cola.

5.1 Estudio de preferencia

El primer análisis sensorial buscaba determinar cuál de las formulaciones presentaba mayor preferencia por parte de los consumidores; en la Tabla 18 se muestran los tratamientos con diferentes concentraciones de menta, además de los correspondientes códigos aplicados en el estudio.

Tabla 18: Tratamientos

Tratamientos	T4	T6	T5
Muestra	A	B	C
Concentración	0,01%	0,03%	0,02%
Códigos	413	819	615

Un total de 99 (100%) personas consumidoras de bebidas lácteas, entre 18 a 65 años, participaron en el estudio. La distribución por género de la muestra fue de 65 mujeres (65,66%) y 34 hombres (34,34%).

50 mL de cada muestra a 20 °C fueron colocados en vasos de poliestireno de 100 mL, además de agua desmineralizada para que los panelistas puedan enjuagarse la boca entre cada muestra.

Para el estudio sensorial es necesario codificar, con números aleatorios, las muestras para no generar preferencia por los números asignados.

Las muestras A,B y C se presentaron el mismo número de veces en las tres posiciones; esto con el fin de minimizar la variable de preferencia por la posición de la muestra (error experimental).

Para el análisis estadístico, se utilizó el Índice R (método no paramétrico). Para el estudio de preferencia, los panelistas asignaron números a cada una de las muestras, siendo “1” mayor preferencia y “3” menor preferencia.

5.1.1 Resultados y discusión

En la Tabla 19 se muestran los resultados estadísticos del estudio de preferencia.

Tabla 19: Estadísticos del estudio de preferencia.

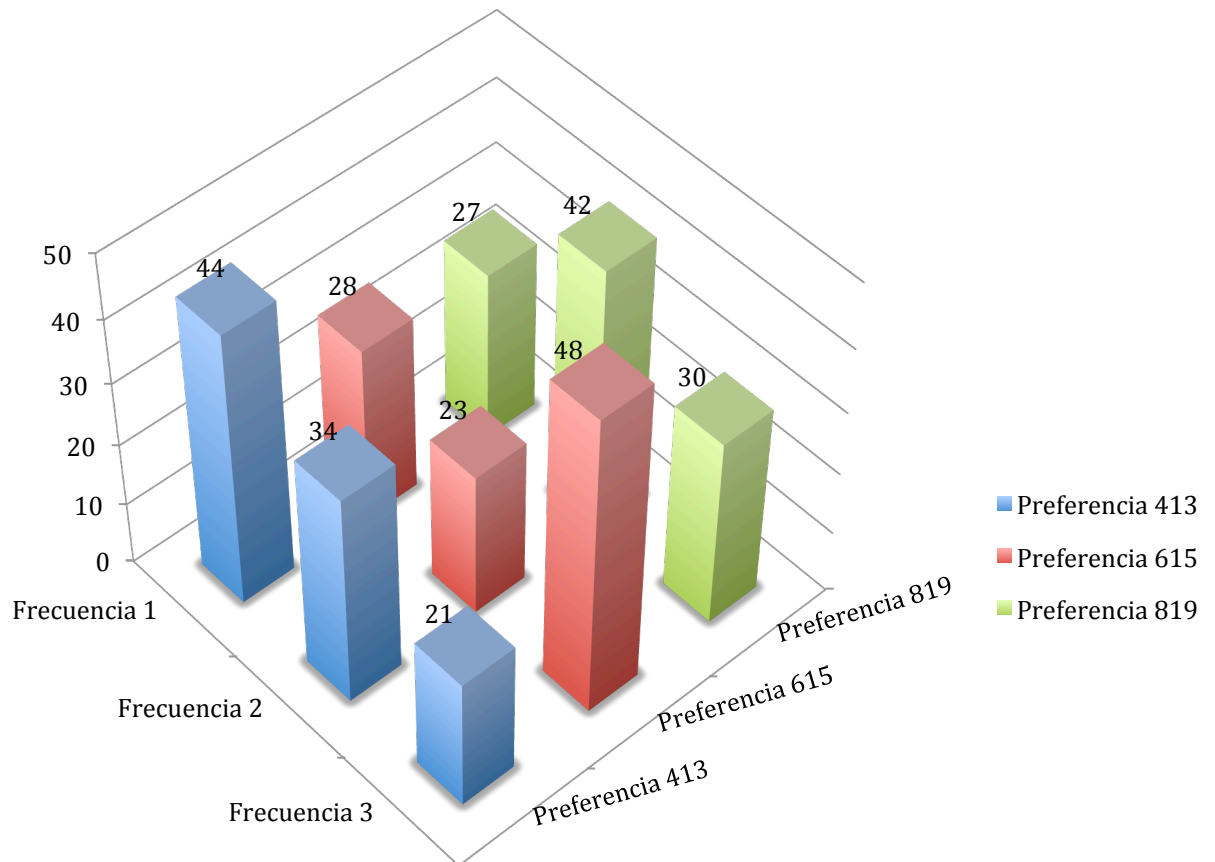
Código de muestra	Sumatoria	Moda	Frecuencia 1	Frecuencia 2	Frecuencia 3
413	175	1	44	34	21
615	218	3	28	23	48
819	201	2	27	42	30

Con los estadísticos de frecuencia, moda y sumatoria, se observa que la muestra 413 tuvo la mayor preferencia con 44 frecuencia de 1 (mayor preferencia) 34 calificaciones de 2 y 21 frecuencias de 3 (menor preferencia). Estas calificaciones produjeron una sumatoria menor que las dos otras muestras manteniendo una moda 1. Mientras menor es la sumatoria, mayor es la preferencia, ya que indica cual fue escogida mayor número de veces en las dos primeras posiciones. La muestra 615 fue la menos preferida.

El Gráfico 1 presenta la frecuencia de la preferencia.

Gráfico 1: Frecuencia de la Preferencia

Grafico de Preferencia



	Frecuencia 1	Frecuencia 2	Frecuencia 3
Preferencia 413	44	34	21
Preferencia 615	28	23	48
Preferencia 819	27	42	30

Índice R (IR)

Para el IR se trabajó con una comparación directa; por lo que en las Tablas 20, 21 y 22 se separan las preferencias de las muestras para comparaciones simples.

Tabla 20: Frecuencias de A y B

Muestra	Categoría		
	Frecuencia 1	Frecuencia 2	Frecuencia 3
A	44	34	21
C	28	23	48

Ho: No existió diferencia estadísticamente significativa entre A y C con respecto a la preferencia.

Ha: A tuvo un nivel de preferencia estadísticamente mayor a C.

$R_c = 0,7192$

$R_c (\%) = 71,92\%$

Valor crítico = 0,5621

El valor R calculado fue mayor al valor R crítico ($0,7192 > 0,5621$), rechazándose la hipótesis nula y se aceptó Ha; A tuvo un nivel de preferencia estadísticamente mayor a C.

En la Tabla 21 se presentan las frecuencias de A y B

Tabla 21: Frecuencias de A y B

Muestra	Categoría		
	Frecuencia 1	Frecuencia 2	Frecuencia 3
A	44	34	21
B	27	42	30

Ho: No existió diferencia estadísticamente significativa entre A y B con respecto a la preferencia.

Ha: A tuvo un nivel de preferencia estadísticamente mayor a B.

$R_c = 0,7386$

$R_c (\%) = 73,86\%$

Valor crítico = 0,5607

El valor R calculado fue mayor que el valor R crítico ($0,7386 > 0,5607$) rechazándose la hipótesis nula y se aceptó Ha; A tuvo un nivel de preferencia estadísticamente mayor a B.

En la Tabla 22 se presentan las frecuencias de B y C

Tabla 22: Frecuencia de B y C

Muestra	Categoría		
	Frecuencia 1	Frecuencia 2	Frecuencia 3
C	28	23	48
B	27	42	30

Ho: No existió diferencia estadísticamente significativa entre C y B con respecto a la preferencia.

Ha: C tuvo un nivel de preferencia estadísticamente mayor a B.

$R_c = 0,5360$

$R_c (\%) = 53,60\%$

Valor crítico = 0,5688

El valor R calculado fue menor que el valor R crítico ($0,5360 < 0,5688$), por lo que se aceptó Ho, no existió diferencia estadísticamente significativa entre C y B con respecto a la preferencia.

En la tabla 23 se muestran los niveles de las diferentes formulaciones

Tabla 23: Nivel de preferencia

Muestras (código)	Nivel de preferencia (moda)
A (413)	1 (a)
B (819)	2 (b)
C (615)	3 (b)

Modas seguidas por las mismas letras no presentan diferencia estadística al 5% de probabilidad por la prueba IR

Discusión

- De acuerdo al análisis con el Índice R (IR), existió una diferencia estadísticamente significativa entre A y C (413 y 615) teniendo un IR= 71,92% con un α de 0,05.
- Así mismo A y B (413 y 819 respectivamente) presentaron una diferencia estadísticamente significativa con un α de 0,05 obteniendo un IR= 73,86%

- Las muestras 615 y 819, al tener un IR=53,60%, siendo menor que el estadístico de prueba (56,88%) no presentaron una diferencia estadística
- A presentó la mayor preferencia en el estudio, mientras que C y B tuvieron la preferencia 2.

5.2 Estudio de aceptación

Se realizó una prueba de nivel de agrado de 7 puntos y posteriormente un estudio con grupos focales.

La primera prueba fue realizada con el fin de determinar la aceptación de la muestra (413) que obtuvo la mayor preferencia en el estudio anterior. En la Tabla 24, se muestra la formulación utilizada para este estudio.

Tabla 24: Formulación para estudio de aceptación

Ingrediente	Concentración (g/100g)
Suero de leche	69,49
Glicerol	15,00
Eritritol	8,00
Chocolate	6,00
Menta	0,01
Emulsificante	0,10
Goma arábica	0,20
Citrato de sodio	0,20
Sacarosa	1,00

El porcentaje de menta fue determinado mediante el estudio de preferencia; los porcentajes de glicerol, eritritol y chocolate fueron determinados mediante el diseño experimental.

5.2.1 Nivel de agrado

Materiales y métodos

Al igual que con el estudio de preferencia, la prueba de agrado se realizó con 99 personas; se escogieron consumidores de bebidas lácteas, entre 18 a 65 años, 60 mujeres (60,61%) y 39 hombres (39,39%).

50 mL de cada muestra a 20 °C fueron colocados en vasos de poliestireno de 100 mL, además de agua desmineralizada para que los panelistas puedan enjuagarse la boca

Para el estudio de agrado se utilizó una escala hedónica de 7 puntos con un nivel medio de indiferencia (ni gusta/ni disgusta).

En la Tabla 25 se muestran los resultados obtenidos del estudio de nivel de agrado, y en la Tabla 26 se muestran las respuestas de los grupos focales.

Para realizar el análisis estadístico, a cada una de las opciones de la escala hedónica se le asignó un número para obtener una valoración que represente el nivel de agrado final.

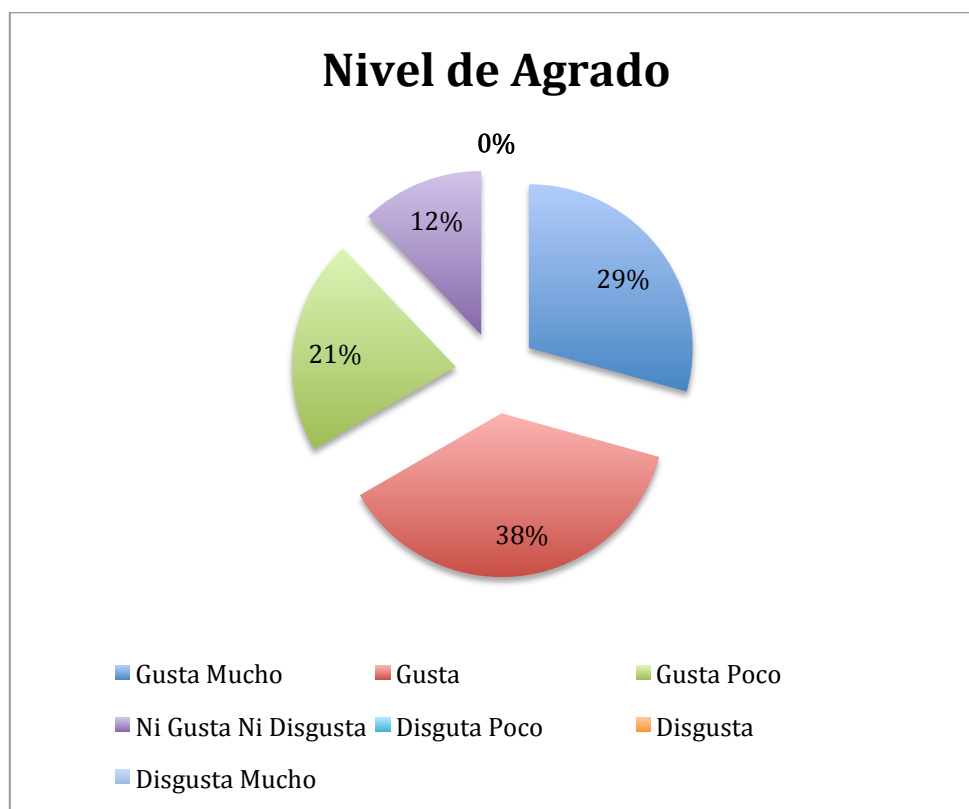
Tabla 25: Nivel de agrado

	Nivel de Agrado						
	Gusta Mucho	Gusta	Gusta Poco	Ni Gusta Ni Disgusta	Disgusta Poco	Disgusta	Disgusta Mucho
Valor Numérico Asignado	7	6	5	4	3	2	1
Frecuencia	29	37	21	12	0	0	0
Nivel de Agrado Final	5,84						

Como se puede observar en la Tabla 25, la opción “gusta” fue la de mayor frecuencia con 37 elecciones; le sigue “gusta mucho” con 29; “gusta poco” 21; ”Ni gusta, ni disgusta” fue escogido 12 veces. Es importante notar que las opciones de disgusto no fueron escogidas.

En el Gráfico 2 se puede ver reflejadas las preferencias porcentualmente.

Gráfico 2 Opciones escogidas por los consumidores expresadas en porcentajes



Los resultados obtenidos muestran que el nivel de agrado promedio de la bebida fue de 5,84; estando más cerca del valor asignado a “gusta” que a “gusta poco”. La bebida obtenida presentó con un adecuado nivel de agrado.

5.2.2 Grupo focal

Materiales y métodos

El estudio con el grupo focal se realizó concluido el nivel de agrado; fue conducido con 99 panelistas en total (3 grupos de 25 personas y un grupo de 24); 60 mujeres y 39 hombres.

A los asistentes se les realizó una serie de preguntas concernientes a la bebida.

50 mL de cada muestra a 20 °C fueron colocados en vasos de poliestireno de 100 mL, además de agua desmineralizada para que los panelistas puedan enjuagarse la boca entre cada muestra.

Para el posterior análisis del grupo focal se procedió a grabar en video los grupos focales.

Resultados y discusión

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 26.

Tabla 26: Respuestas del grupo focal

Pregunta	Respuesta	Respuestas	Porcentaje		
			Respuesta 1 (%)	Respuesta 2 (%)	Respuesta 3 (%)
1.- ¿Primero quisiera saber si conocen lo que es el suero de leche?	Sí	73	73,74	26,26	N/A
	No	26			
2.- ¿Saben cuáles son las características del suero de leche?	Sí	5	5,05	94,95	N/A
	No	94			
3.- ¿El sabor a chocolate les pareció adecuado?, ¿muy alto o muy bajo?	Adecuado	83	83,84	6,06	10,10
	Muy alto	6			
	Muy bajo	10			
4.- ¿El dulzor es adecuado?, ¿muy alto o muy bajo?	Adecuado	93	93,94	6,06	0,00
	Muy alto	6			
	Muy bajo	0			
5.- Con respecto al contenido de menta, ¿era el adecuado o tenía mucho sabor a menta?	Adecuado	89	89,90	10,10	N/A
	Alto	10			

Pregunta	Respuesta	Respuestas	Porcentaje		Porcentaje	
			Respuesta 1 (%)	Respuesta 2 (%)	Respuesta 3 (%)	Respuesta 4 (%)
6.- En general, ¿qué les pareció la bebida, en cuanto a: sabor, apariencia, textura y color?	Gusta	10	10,10	3,03	86,87	N/A
	Indiferente	3				
	Disgusta	86				
7.- ¿Consumirían la bebida?	Si	10	10,10	89,90	N/A	N/A
	No	89				
8.- ¿Estarían dispuestos a comprar la bebida en una presentación de 200 mL, 250 mL o 1L?	200 mL	6	6,06	0,00	4,04	89,9
	250 mL	0				
	1 L	4				
	No estaría dispuesto a comprar	89				
9.- ¿Estarían dispuestos a comprar la bebida, para consumo personal o para consumo familiar?	Personal	2	2,02	8,08	89,9	N/A
	Familia	8				
	No estaría dispuesto a comprar	89				

Las preguntas más importantes a considerar para el estudio de aceptación, fueron las 6, 7, 8 “¿En general, que les pareció la bebida en cuanto a: sabor, apariencia, textura y color? ¿Consumiría esta bebida? ¿Estaría dispuesto a comprar la bebida en una presentación de 200 mL, 250 mL o 1L?”. A la pregunta 6 el 89,90% (89 consumidores) respondió que no

ya que, a pesar que tenía un sabor agradable, la bebida dejaba una sensación de comezón o ardor en la garganta. La sensación empeoraba conforme se consumía más de la bebida.

5.3 Discusión del estudio de aceptación

La escala hedónica del estudio sensorial mostró resultados positivos, ya que la media del estudio fue de 5,84, estando más cerca de “gusta” que de “gusta poco”. Al 29% de los panelistas “gusta mucho la bebida”, al 38% “gusta”, al 21% “gusta poco” y al 12% “ni gusta ni disgusta”, por lo tanto el 88% de los jueces encontraba agradable la bebida, de acuerdo al estudio hedónico; y lo más importante, considerándose un resultado positivo, fue que a ningún panelista la bebida le disgustó.

Sin embargo, el estudio conducido a nivel de grupos focales, reflejó que la bebida tenía dos momentos en la degustación. Al inicio los consumidores describieron a la bebida como deseada, ya que las características sensoriales (sabor, palatabilidad, olor y apariencia) eran agradables; pero esta percepción duró únicamente con los primeros bocados; pasada esta primera etapa, la bebida dejó una sensación de ardor en la garganta, que produjo rechazo haciendo que los consumidores no deseen adquirir la bebida.

Este problema se debió a la cantidad de glicerol y eritritol necesaria para que la proteína del suero sea estable al tratamiento térmico y permanezca en suspensión; por este motivo, no es posible reformular la bebida para obtener la aceptación de los consumidores.

6 Conclusiones

El efecto estabilizador del glicerol y el eritritol sobre la proteína del suero de leche, fue eficiente ya que la turbidez de todos los tratamientos disminuyeron y el T9 (mejor tratamiento) no presentó una diferencia estadísticamente significativa con respecto al tratamiento blanco sin tratamiento térmico. Esto indica que la proteína permanece en

suspensión coloidal de la misma forma que en suero sin tratar según lo deseado a la hora de elaborar una bebida a base de suero de leche.

Se logró aumentar la estabilidad térmica de la proteína de suero de leche con la adición de ambos estabilizadores utilizados, tanto la turbidez como la cantidad de material insolubilizado disminuyeron. La proteína dentro de la bebida no formó un precipitado y permaneció en suspensión.

La adición de ambos compuestos generaron una sensación de ardor en la garganta al momento de consumir la bebida, a pesar del sabor agradable, debido a los compuestos de sabor (menta y chocolate). Por tanto, no se podrían utilizar para estabilizar la proteína ya que los consumidores rechazaron la bebida.

A pesar que se logró elaborar una bebida a base de suero de leche con la ayuda de los estabilizantes agregados (aumento de la estabilidad de las proteínas del suero a un tratamiento térmico y permanencia en suspensión coloidal), los consumidores no estuvieron dispuestos a comprarla debido al regusto que dejó.

7 Recomendaciones

Utilizar otros compuestos que puedan estabilizar la proteína; pero que, a diferencia de los utilizados en el presente estudio, no generen características sensoriales adversas.

Realizar ensayos con diferentes gomas en diferentes concentraciones.

Utilizar diferentes sales sulfatantes para estabilizar la proteína.

Probar diferentes alternativas de producción para el suero de leche, ya sea como materia prima principal o como ingrediente.

A pesar que según el Codex Alimentarius, tanto el glicerol como el eritritol no tienen dosificación máxima, algunos estudios sugieren que pueden aumentar la cantidad de azúcar en la sangre, y tener efectos contraproducentes a nivel intestinal, por lo que en este producto no sería recomendado realizar estudios con personas pertenecientes a grupos de riesgo (Niños y Adultos de la 3ra edad) (Presidencia de la República Oriental del Uruguay - Secretaría de Prensa y Difusión, 2004; Grupo español de pacientes con cancer, 2010)

8 Bibliografía

Adams, M. R., & Moss, M. O. (2000). *Food Microbiology*. Guildford: The Royal Society of Chemistry.

Albis Arrieta , A. R. (2009). Universidad Nacional De Colombia Facultad De Ciencias Departamento De Química . *Estudio Termodinámico del Efecto de Cuatro Polioles y Glucosa sobre la Estabilidad de la α -Lactoalbúmina en Solución Acuosa* . Bogota, Colombia.

Anil, K., Avneet, R., Kum, C., & Kum, J. (2011). Formulation Of Tomato Juice Enriched Whey Beverage Using Response Surface Methodology. *J. Dairying, Foods & H.S.* , 30 (1), 1-14.

Arakawa, T., & Timasheff, S. (1982). Stabilization of protein-structure by sugars. *Biochemistry* , 21 (25), 6536-44.

Atra, R., Balint, A., Bekassy-Molnar, E., & Vatai, G. (2005). Investigation of ultra-and nanofiltration for utilization of whey protein and lactose. *Journal of Food Engineering* , 67 (3), 325-32.

- Baier, S., Decker, E., & McClements, D. (2004). Impact of glycerol on thermostability and heat-induced gelation of bovine serum albumin. *Food Hydrocolloid* , 18 (1), 91–100.
- Beecher, J., Drake, M., Foegeding, E., & Luck, P. (2008). Factors regulating astringency of whey protein beverages. *J Dairy Sci* , 91, 2553-60.
- Belloso-Morales, G., & Hernández-Sánchez, H. (2003). Manufacture of a beverage from cheese whey using a “tea fungus” Fermentation. *Revista Latinoamericana de Microbiología* , 45 (1-2), 5-11.
- Bhavsagar, M. S., Awaz, H. B., & Patange , U. L. (2010). MANUFACTURE OF PINEAPPLE FLAVOURED BEVERAGE FROM CHHANA WHEY. *J. Dairying, Foods & H.S* , 29 (2), 110 - 113 .
- Blom, W. A., Lluch, A., Stafleu, A., Vinoy, S., Holst, J. J., Schaafsma, G., et al. (2006). Effect of a high-protein breakfast on the postprandial ghrelin response. *Am J Clin Nutr* , 83, 211-220.
- Bowen, J., Noakes, M., & Clifton, P. M. (2006a). Appetite regulatory hormone responses to various dietary proteins differ by body mass index status despite similar reductions in ad libitum energy intake. *J Clin Endocrinol Metab* , 91,2913–2919.
- Bowen, J., Noakes, M., Trenerry, C., & Clifton, P. M. (2006b). Energy intake, ghrelin, and cholecystokinin after different carbohydrate and protein preloads in overweight men. *J Clin Endocrinol Metab* , 91, 1477–1483.

- Borsheim, E., Aarsland, A., & Wolfe, R. (2004). Effect of an amino acid, protein, and carbo- hydrate mixture on net muscle protein balance after resistance exercise. *Int J Sport Nutr Exe* , 14 (3), 255-71.
- Caitlin, E., Etzel, M. R., & LaClair. (2009). Turbidity and Protein Aggregation in Whey Protein Beverages . *JOURNAL OF FOOD SCIENCE* , 74 (7), 526-35.
- Caitlin, E., Etzel, L., & Etzel, M. R. (2010). Ingredients and pH are Key to Clear Beverages that Contain Whey Protein. *Journal of Food Science* , 75 (1), C21-C27.
- Cuellas, A. (2008). Aprovechamiento industrial del suero de quesería. Obtención de una bebida energizante a partir del efluente . *Tecnología Láctea Latinoamericana* , 49, 56-58.
- Cuellas, A., & Wagner, J. (2010). Elaboración de bebida energizante a partir de suero de quesería . *Revista del Laboratorio Tecnológico del Uruguay* (5), 54-57.
- Chauhan, A. K., Kumar, J., & Rajoria, A. (2010). Anti-oxidative and anti-carcinogenic role of lycopene in human health – A Review. *J. Dairying, Food and Home Sci* , 29, 3-4.
- Cock, A., & Hubertus, P. W. (2004). *Patente n° ES 2212 469 T3*. España.
- Cummings, D. E., Frayo, R. S., Marmonier , C., Aubert, R., & Chapelot, D. (2004). Plasma ghrelin levels and hunger scores in humans initiating meals voluntarily without time- and food-related cues. *Am J Physiol Endocrinol Metab* , 287, E297–E304.

Damodaran, S., & Parkin, K. (2007). *Fennema.Fennema's food chemistry* (4th ed ed.).

Boca Raton: CRC/Taylor & Francis.

Diary Foods. (1 de Agosto de 2005). *Whey's Future in Beverages*. Retrieved 14 de Octubre de 2012 from Diary Foods: www.diaryfood.com/articles/whey-s-future-in-beverages

Dragone, G., Mussatto, S. I., Oliveira, J. M., & Teixeira, J. A. (2009). Characterisation of volatile compounds in an alcoholic beverage produced by whey fermentation. *Food Chemistry* , 112, 929-935.

Etzel, M. (2004). Manufacture and use of dairy protein fractions. *J Nutr* , 996S–1002S.

Flanagan, D. E., Evans, M. L., Monsod, T. P., Rife, F., Heptulla, R. A., Tamborlane, W., et al. (2003). The influence of insulin on circulating ghrelin. *Am J Physiol Endocrinol Metab* , 284, E313–E316.

Gerder, S. (2007). Why Whey for Clear Beverages? *Ingredient Technology* , 96.

González-Martínez, C., Albors, A., Becerra, M., Carot, J. M., Cháfer, M., & Chiralt, A. (2002). Influence of substituting milk powder for whey powder on yoghurt quality. *Trends in Food Science & Technology* , 13 (9-10), 334-240.

Grupo español de pacientes con cancer. (01 de 09 de 2010). Obtenido de Recomendaciones básicas para pacientes en relación a la toxicidad por quimioterapia: http://www.gepac.es/docs/Toxicidad_Quimioterapia-LR.pdf

Guimarães, P. M., Teixeira, J. A., & Domingues, L. (2012). Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. *Biotechnology Advances* , 28, 375-384.

- Gupta, V. K., & Mathur, B. N. (1989). *Indian Dairyman* , 41 (3), 165-167.
- Ha, E., & Zemel, M. (2003). Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people (Review). *J Nutr Biochem* , 14 (5), 251-8.
- Hoogstraten, J. (1987). Process for Preparation of Chocolate Drink Based on Acid Whey. *IDF Bulletin* , 212, 17.
- Jacobs LJ, P. W. (1987). *Handbook of separation process technology*. (R. RW, Ed.) New York: John Wiley & Sons.
- Layman, D. (2003). The role of leucine in weight loss diets and glucose homeostasis. *J Nutr* , 261S–7S.
- Layman, D., & Baum, J. (2004). Dietary protein impact on glycemic control during weight loss. *J Nutr* , 968S–73S.
- Legarová, V., & Kourimská, L. (2010). Sensory quality evaluation of whey-based beverages. *Mljekarstvo* , 60 (4), 280-287.
- Magalhães, K., Pereira, M., & Nicolau. (2010). Production of fermented cheese whey-based beverage using kefir grains as starter culture: evaluation of morphological and microbial variations. *Bioresource Technology* , 101, 8843–8850.
- McClements, D. (2002). Modulation of globular protein functionality by weakly interacting cosolvents. *Crit Rev Food Sci* , 42 (5), 417–71.
- Millard-Stafford, M., Warren, G., Thomas, L., Doyle, J. S., Snow, T., & Hitchcock, K. (2005). Recovery from run training: efficacy of a carbohydrate-protein beverage? *Int J Sport Nutr Exerc* , 15 (6), 610-24.

- Minhas, S., & Sood, S. (2011). ORGANOLEPTIC AND MICROBIOLOGICAL EVALUATION OF CHEESE-WHEY AND SOY-WHEY BASED PEAR BEVERAGE. *J. Dairying, Foods & H.S.*, 30 (2), 90-93.
- Miranda, O. (2007). Elaboración de una bebida fermentada a partir del suero de queso. Características distintivas y control de calidad. *Revista Cubana Alimentación y Nutrición*, 17 (2), 103-108.
- Monsalve, J., & González, D. (2005). Elaboración de un queso tipo Ricotta a partir de suero lácteo y leche fluida. *Revista Científica*, XV (6), 543-550.
- Presidencia de la República Oriental del Uruguay - Secretaría de Prensa y Difusión. (24 de 06 de 2004). *Decreto*. Recuperado el 20 de 01 de 2014, de Agenda Metropolitana: <http://archivo.presidencia.gub.uy/decretos/2004062805.htm>
- Romero, C., Lozano, J., Sancho, J., & Giraldo, G. (2007). Thermal stability of beta-lactoglobulin in the presence of aqueous solution of alcohols and polyols. *Int J Biol Macromol*, 40 (5), 423-8.
- Saad, M. F., Bernaba, B., Hwu, C. M., Jinagouda, S., Fahmi, S., Kogosov, E., et al. (2002). Insulin regulates plasma ghrelin concentration. *J Clin Endocrinol Metab*, 87, 3997-4000.
- Sánchez-Otero, J. (2009). *Introducción al Diseño Experimental*. Quito: Julio Sánchez-Otero.
- Severin, S., & Xia, W. (2005). Milk biologically active components as nutraceuticals: review. *Crit Rev Food Sci*, 45 (7-8), 645-56.

Smithers, G. (2008). Whey and whey proteins—from ‘gutter-to-gold’. *Int Dairy J*, 18 (7), 695-704.

Relkin, P., Eynard, L., Launay, B.: Thermodynamic parameters of β - Lactoglobulin and α -Lactalbumin. A DSC study of denaturation by heating. *Thermochim. Acta* 204, 111-121 (1992).

Tang, J. E., Manolagos, J. J., Kujbida, G. W., Lysecki, P. J., Moore, D. R., & Phillips, S. M. (2007). Minimal whey protein with carbohydrate stimulates muscle protein synthesis following resistance exercise in trained young men. *Appl. Physiol. Nutr. Metab*, 32, 1132-1138.

Tipton, K., Elliott, T., Cree, M., Aarsland, A., & Sanford, A. (2007). Stimulation of net muscle protein synthesis by whey protein ingestion before and after exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 292 (1), E71–6.

9 Anexos

Anexo 1: Turbidez (NTU)

	Tratamientos										
	TB CTT	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	TB STT
Repetición 1	1743	1735	1705	1617	1573	1534	1347	1331	1149	1033	1026
Repetición 2	1758	1745	1696	1646	1584	1533	1371	1324	1133	1038	1014
Repetición 3	1749	1733	1709	1625	1565	1538	1395	1337	1127	1035	1016
Sumatoria	5250	5213	5110	4888	4722	4605	4113	3992	3409	3106	3056
Media	1750,00	1737,67	1703,33	1629,33	1574,00	1535,00	1371,00	1330,67	1136,33	1035,33	1018,67
Desviación Estandar	7,55	6,43	6,66	14,98	9,54	2,65	24,00	6,51	11,37	2,52	6,43

Anexo 2: Material Insolubilizado (g/100 L)

	Tratamientos										
	TB CTT	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	TB STT
Repetición 1	2,4750	2,3643	2,1782	1,8008	1,5064	1,2965	0,9538	0,5980	0,0767	0,0327	0,0265
Repetición 2	2,4233	2,3537	2,0965	1,6889	1,4787	1,3087	0,8634	0,4645	0,1574	0,0304	0,0287
Repetición 3	2,4596	2,3317	2,1007	1,7086	1,5008	1,3008	0,9467	0,4527	0,0963	0,0317	0,0294
Sumatoria	7,3579	7,0497	6,3754	5,1983	4,4859	3,9060	2,7639	1,5152	0,3304	0,0948	0,0846
Media	2,4526	2,3499	2,1251	1,7328	1,4953	1,3020	0,9213	0,5051	0,1101	0,0316	0,0282
Desviación Estandar	0,0265	0,0166	0,0460	0,0597	0,0146	0,0062	0,0503	0,0807	0,0421	0,0012	0,0015

Anexo 3: Medidas de viscosidad (cP)

	Tratamientos								
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9
Repetición 1	22	23	24	48	48	49	114	113	116
Repetición 2	25	26	23	50	49	51	117	112	113
Repetición 3	24	23	25	47	49	45	112	116	115
Sumatoria	71	72	72	145	146	145	343	341	344
Media	23,67	24,00	24,00	48,33	48,67	48,33	114,33	113,67	114,67
Desviación Estandar	1,53	1,73	1,00	1,53	0,58	3,06	2,52	2,08	1,53

Anexo 4: Cantidad de grasa (g/100 L)

	Tratamientos								
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9
Repetición 1	2,2430	2,4757	2,5584	3,5274	3,5287	3,5300	4,9174	4,9987	4,7016
Repetición 2	2,4542	2,3587	2,4632	3,6529	3,6386	3,5243	4,6272	4,7809	4,7056
Repetición 3	2,5472	2,5484	2,3796	3,4889	3,4142	3,5395	4,6049	4,4102	4,8035
Sumatoria	7,2444	7,3828	7,4012	10,6692	10,5815	10,5938	14,1495	14,1898	14,2107
Media	2,4148	2,4609	2,4671	3,5564	3,5272	3,5313	4,7165	4,7299	4,7369
Desviación Estandar	0,1559	0,0957	0,0895	0,0858	0,1122	0,0077	0,1743	0,2975	0,0577

Anexo 4: Orden de presentación de las muestras

Muestra	1	2	3
A	33	33	33
B	33	33	33
C	33	33	33