Universidade de Aveiro
2019

Departamento de Química

Ligia Inés Rodríguez Piedrahita

Efeito da Alta pressão hidrostática e de Ultrassons de potência na funcionalidade tecnológica das proteínas lácteas

Efecto de la alta presión hidrostática y el ultrasonido de potencia en la funcionalidad tecnológica de las proteínas lácteas

Universidade de Aveiro Departamento de Química
2019

Ligia Inés Rodríguez Piedrahita

Efeito da Alta pressão hidrostática e de Ultrassons de potência na funcionalidade tecnológica das proteínas lácteas

Efecto de la alta presión hidrostática y el ultrasonido de potencia en la funcionalidad tecnológica de las proteínas lácteas

Tese apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em "Ciência e Tecnología de Alimentos e Nutrição, realizada sob a orientação científica da Doutora Ivonne Delgadillo, Professora Associada com Agregação e do Doutor Jorge Saraiva Investigador Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Tesis presentada a la Universidad de Aveiro como requisito parcial para optar al título de Doctor en "Ciência e Tecnología de Alimentos e Nutrição", realizada bajo la dirección científica de la Doctora Ivonne Delgadillo Profesora Asociada con Agregación del Departamento de Química y del Doctor Jorge Saraiva Investigador Auxiliar del Departamento de Química de la Universidade de Aveiro

Apoio financeiro da Universidad Jorge Tadeo Lozano, Colômbia

A Jairo, Felipe y Natalia por prestarme para este sueño el tiempo que les pertenece

o júri

presidente

Doutor Paulo Jorge de Melo Matias Faria de Vila Real
Professor Catedrático, Departamento de Engenharia Civil, Universidade de Aveiro

Doutor António Augusto Martins de Oliveira Soares Vicente
Professor Associado com Agregação, Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho

Doutora Margarida Gomes Moldão Martins
Professora Associada com Agregação. Departamento de Ciências e Engenharia de Biosistemas, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa.

Doutora Ana Maria Pissarra Coelho Gil
Professora Associada com Agregação Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Doutora Ana Maria Pereira Gomes
Professora Associada, Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa

Doutora Ivonne Delgadillo Giraldo
Professora Associada com Agregação (aposentada). Departamento de Química da Universidade de Aveiro (orientadora)

agradecimentos

A la Universidad Jorge Tadeo Lozano por apoyar no solo económicamente sino en todas las formas posibles el desarrollo de mis estudios doctorales.

A la Doctora Ivonne Delgadillo por creer que para mí aún era posible alcanzar este sueño y por haber puesto a mi disposición con total generosidad su conocimiento y experiencia técnica, por ser una gran guía durante todo el trabajo de investigación y el proceso de escritura, por sus importantes aportes, comentarios y sugerencias. Y sobre todo por demostrarme su confianza, por ayudarme en muchos momentos de múltiples formas.

Al Doctor Jorge Saraiva por todo el tiempo que dedicó a enseñarme, su precisa e invaluable crítica constructiva y su apoyo permanente en la realización de los ensayos tanto de altas presiones hidrostáticas como de ultrasonido.

A la Universidad de Aveiro, Departamento de Química por facilitar los espacios y el equipamiento en cada una de las fases de esta investigación.

Al Dr. Dmitry Victorovitch Evtyugin por facilitarme el equipo necesario para las mediciones de tamaño de partícula y potencial Z, al Dr. José A. Lopes da Silva por permitirme el uso del equipo para las mediciones de textura, a la Dra. Alis Pataquiva por facilitarme los medios para completar los análisis de microestructura, a María Celeste Coimbra de Azevedo por permitirme realizar las mediciones de hidrofobicidad en el laboratorio a su cargo y ayudarme con las metodologías.

A Rita Inácio por sus enseñanzas en los temas relacionados con textura, a Anne Marie Costa por explicarme el manejo del laboratorio y por su amistad, a Rui Queiros, Ricardo Duarte y Álvaro Lemos por su apoyo con los ensayos de alta presión.

A la Dra. Laura Conde y su esposo Ariel Cadena, por su ánimo constante y apoyo en las difíciles tareas editoriales. A Felipe por su inmensa ayuda y paciencia en la realización y escritura de este trabajo.

palavras-chave

Alta pressão hidrostática, Ultrassons de potência, queijo fresco, modificação de proteína*, petit suisse*, gel de proteína.

resumo

Tecnologias como alta pressão hidrostática (HHP) e ultrassom (UP) têm surgido como alternativas aos processos térmicos tradicionais pois, além de aumentar a vida útil em alimentos processados, podem fazê-lo com pequenas alterações nos aspectos organolépticos e nutricionais.

Embora a aplicação de tecnologias não térmicas no campo da indústria alimentar se tenha concentrado na preservação de alimentos, com o desenvolvimento de tecnologias e pesquisas em torno de novas aplicações, surgem outras oportunidades para a indústria. Nesse contexto, o objetivo desta tese de doutoramento foi o desenvolvimento de produtos lácteos, através da modificação funcional das proteínas do leite por aplicação de alta pressão hidrostática (PHH) em um intervalo entre 200 e 600 MPa, com tempos entre 5 e 20 min e ultrassons de potência (UP), numa faixa entre 128 e 218 W para tempos entre 1 e 10 min. A pesquisa concentrou-se em compreender as mudanças na estrutura e interações entre as proteínas e a água, a capacidade de retenção de água e o efeito na textura, o desempenho de coagulação e a hidrofobicidade superfícial.

Para compreender as mudanças ao nível molecular, nas proteínas insolúveis (caseínas) e nas proteínas solúveis (proteínas do soro do leite), foi utilizada espectroscopia de infravermelho medio com transformada de Fourier (FTMIR), foram avaliadas as alterações na hidrofobicidade superficial por acoplamento químico com um fluoróforo externo, foram estudadas as mudanças na micela medindo o tamanho e o potencial zeta, bem como foi observada a microestrutura por microscopia SEM. Foram encontrados efeitos na estrutura secundária das proteínas do soro e no tamanho das partículas e na hidrofobicidade superficial das caseínas.

Com base nestes resultados, propôs-se o desenvolvimento de um queijo Petit Suisse aromatizado com frutas naturais sob um delineamento experimental de misturas e usando proteínas modificadas pela aplicação de altas pressões hidrostáticas. Os efeitos encontrados efeitos no a cinética de fermentação e comportamento reológico ajustaram-se aos modelos de Weibull e Weltmann, respectivamente.

O desenvolvimento de um gel de proteína para atletas de alto rendimento foi também proposto, promovendo o processo de gelificação por interações entre proteínas e kappa carragenina pela aplicação de ultrassom e altas pressões hidrostáticas.

Este estudo mostra que mudanças nas propriedades funcionais das proteínas, pela aplicação das tecnologias HHP e UP, podem ser utilizadas na fabricação de produtos comerciais com propriedades físicas e nutricionais aperfeiçoadas.

palabras-clave

Altas presiones hidrostáticas, Ultrasonido de potencia, queso fresco, modificación de proteínas, *Petit Suisse*, gel proteico.

resumen

Tecnologías como la alta presión hidrostática (HHP) y ultrasonido (UP) han emergido como alternativas a los procesos térmicos tradicionales, pues además de posibilitar la prolongación de la vida de estante en alimentos procesados, pueden hacerlo con menores cambios en los aspectos organoléptico y nutricional.

Aunque la aplicación de tecnologías no térmicas en el campo de la industria alimentaria se ha enfocado en la conservación de alimentos, con el desarrollo de las tecnologías e investigación en torno a nuevas aplicaciones surgen otras aplicaciones para la industria. En este contexto, el objetivo de esta tesis doctoral fue la aplicación de alta presión hidrostática (HHP) en un rango entre 200 y 600 MPa con tiempos entre 5 y 20 min y ultrasonidos (UP) en un rango entre 128 y 218 W por tiempos entre 1 y 10 min para el desarrollo de productos lácteos, a través de la modificación funcional de las proteínas lácteas. La investigación se centró en la comprensión de los cambios en la estructura y las interacciones entre las proteínas y el agua, la capacidad de retención de agua y el efecto sobre la textura, el rendimiento de cuajado y la hidrofobicidad superficial.

Para comprender los cambios en el nivel molecular, en las proteínas insolubles (caseínas) y en las proteínas solubles (proteínas de suero de leche), se utilizó espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier, FTMIR, se evaluaron alteraciones en la hidrofobicidad superficial usando un fluoróforo externo por acoplamiento químico, cambios en el tamaño de la micela por la medición del tamaño y potencial zeta, así como el estudio de la microestructura por microscopía SEM. Se encontró un efecto sobre el tamaño de partícula y la hidrofobicidad superficial de las caseínas y sobre la estructura secundaria de las proteínas del suero.

Con base en estos resultados, se propuso el desarrollo de un queso tipo *Petit Suisse* aromatizado con frutas naturales bajo un diseño experimental de mezclas y con proteínas modificadas por la aplicación de altas presiones hidrostáticas, encontrando efectos sobre la cinética de fermentación y el comportamiento reológico que fueron ajustados a los modelos de Weibull y Weltmann respectivamente.

Se propuso también el desarrollo de un gel de proteína para atletas de alto rendimiento, promoviendo el proceso de gelificación por interacciones entre proteínas y kappa carragenina por la aplicación de ultrasonidos y altas presiones hidrostáticas. Este estudio muestra que los cambios en las propiedades funcionales de las proteínas, por la aplicación de tecnologías de HHP y UP, se pueden utilizar en la fabricación de productos comerciales con propiedades físicas y nutricionales mejoradas.

keywords

High hydrostatic pressures, power ultrasounds, fresh cheese, protein modification, *Petit Suisse*, protein gel.

abstract

Technologies such as high hydrostatic pressure (HHP) and ultrasound (UP) have emerged as alternatives to traditional thermal processes, since, in addition to enabling the shelf life in processed foods, those technologies cause minor changes in the organoleptic and nutritional aspects.

Although, the application of non-thermal technologies in the field of the food industry has been focused on food preservation, with the development of this technology and the research around new applications, further uses for these methods in the industry had arisen.

In this context, the objective of this doctoral thesis was the development of dairy products, through the functional modification of milk proteins, applying high hydrostatic pressure (HHP) in a range between 200 and 600 MPa for times between 5 and 20 min and the application of ultrasound (UP) in a range between 128 and 218 W for times between 1 and 10 min. The study focused on the understanding of changes in protein structure and in the interactions between proteins and water, water retention capacity and the effect on texture, curdling performance and surface hydrophobicity.

To understand the changes in insoluble proteins (caseins) and in soluble proteins (whey proteins), at a molecular level, Fourier transform mid infrared spectroscopy (FTMIR) was applied, alterations in surface hydrophobicity were evaluated using an external fluorophore by chemical coupling, changes in the size of the micelle and potential zeta were determined by DLS, and the microstructure was studied by SEM microscopy. The results showed an effect on the secondary structure of whey proteins and on particle size and surface hydrophobicity of caseins.

Based on these results, the creation of a Petit Suisse cheese flavoured with natural fruits was proposed, applying an experimental mixtures design, using proteins modified by the application of high hydrostatic pressures. Effects on fermentation kinetics and rheological behaviour were found and adjusted to Weibull and Weltmann models respectively.

The development of a protein gel for high performance athletes was also proposed, promoting the process of gelation by interactions between proteins and kappa carrageenan by the application of ultrasound and high hydrostatic pressures.

This study shows that changes in the functional properties of proteins, by the application of HHP and UP technologies, can be used in the manufacture of commercial products with improved physical and nutritional properties.

CONTENIDO

Resumo……XII
Resumen……XIV
Abstract……XVI
Tabla de contenido……XVII
Lista de figuras……XXII
Lista de tablas……XXVII
Lista de símbolos y abreviaturas……XXXI
Objetivos y descripción de la tesis……XXXII

CAPITULO 1 Revision Bibliográfica

1. Estructura y funcionalidad de las proteínas de la leche *3*
1.1. Generalidades de las proteínas *3*
1.1.1. Funciones de las proteínas en los alimentos 3
1.2. Proteínas lácteas *4*
1.2.1. Caseínas 4
1.2.2. Proteínas de suero 10
1.2.3. Otros componentes de la leche 12
1.3. Tecnologías de procesamiento *15*
1.3.1. Tecnología de Altas Presiones Hidrostáticas (HHP) 15
1.3.2. Ultrasonido de potencia (UP) 22
1.4. Métodos analíticos *26*
1.4.1. Análisis de textura 26
1.4.2. Determinación del tamaño de partícula (DLS) 28
1.4.3. Hidrofobicidad superficial (H_0) 28
1.4.4. Análisis Infrarrojo con transformada de Fourier (FTMIR) 29
1.4.5. Medición de isotermas de adsorción 32
1.4.6. Microscopia electrónica de barrido SEM 34
1.4.7. Reológia 35
1.5. Herramientas matemáticas *39*
1.5.1. Diseño de experimentos 39
1.5.2. Teoría de mezclas para el desarrollo de productos 41
1.5.3. Modelado y simulación 45

CAPITULO 2 Materiales y métodos

2.1. Materiales *50*
2.1.1. Materiales para ensayos de coagulación 50
2.1.2. Materiales para desarrollo de productos 50
2.2. Equipos de tratamiento *52*
2.2.1. Equipo de alta presión 52
2.2.2. Equipo de ultrasonido de potencia o de baja frecuencia 52
2.3. Métodos *53*
2.3.1. Diseño de Experimental 53
2.3.2. Proceso de coagulación 56
2.3.3. Isotermas de adsorción 60
2.3.4. Medición del tamaño de partícula (DLS) 61
2.3.5. Hidrofobicidad superficial 62
2.3.6. Determinación de Color 62
2.3.7. Análisis Infrarrojo con transformada de Fourier (FTMIR) 62

2.3.8. Caracterización morfológica por microscopía electrónica de barrido SEM 64
2.4. Desarrollo de producto fermentado..... *65*
2.4.1. Cinética de Fermentación..... 65
2.4.2. Comportamiento reológico..... 65
2.4.3. Formulación de mezclas..... 66
2.4.4. Determinación de la vida útil..... 66
2.5. Desarrollo de producto gelificado *68*
2.5.1. Capacidad de retención de agua 68
2.5.2. Medición de las propiedades reológicas 68
2.5.3. Microscopía CRIO-SEM 69
2.5.4. Análisis sensorial..... 70
2.5.5. Evaluación nutricional..... 70
2.5.6. Estudio Microbiológico..... 71
2.6. Análisis estadístico *71*

CAPITULO 3 Efecto de tratamiento HHP y UP

3. Efecto del tratamiento con HHP y UP en la producción de queso y suero *75*
3.1. Introducción..... *75*
3.2. Efecto del tratamiento con Alta Presión *76*
3.2.1. Efecto de HHP sobre el rendimiento quesero 76
3.2.2. Efecto de HHP sobre la textura 81
3.2.3. Efecto del HHP sobre las Isotermas de adsorción 84
3.2.4. Efecto de HHP sobre el tamaño de partícula 90
3.2.5. Efecto de HHP sobre la hidrofobicidad superficial (Ho)..... 93
3.2.6. Efecto de HHP sobre la estructura secundaria FTMIR..... 97
3.2.7. Efecto de HHP sobre la microestructura SEM 105
3.3. Efecto del tratamiento con Ultrasonido *106*
3.3.1. Efecto del ultrasonido sobre le rendimiento quesero 106
3.3.2. Efecto del Ultrasonido sobre la textura 110
3.3.3. Efecto del Ultrasonido sobre el color 113
3.3.4. Efecto del Ultrasonido sobre el tamaño de partícula..... 114
3.3.5. Efecto del Ultrasonido sobre la hidrofobicidad superficial (Ho) 115
3.3.6. Efecto del Ultrasonido sobre la estructura secundaria por FTMIR . 117
3.3.7. Efecto del Ultrasonido sobre la microestructura SEM 119
3.4. Discusión y Conclusiones..... *120*

CAPITULO 4 Desarrollo de producto fermentado

4. Desarrollo de Productos a partir de proteínas lácteas modificadas *127*
4.1. Introducción..... *127*
4.2. Efecto del pretratamiento con HHP *128*
4.2.1. Cinética de Fermentación:..... 129
4.2.2. Comportamiento reológico..... 132
4.3. Diseño de formulaciones *137*
4.3.1. Evaluación de formulaciones..... 138
4.4. Determinación de la vida útil..... *144*
4.4.1. Análisis sensorial para determinar la vida útil 144
4.4.2. Cinética de degradación..... 146
4.5. Calculo de la vida útil sensorial..... *156*
4.6. Discusión y Conclusiones..... *158*

CAPITULO 5 Desarrollo de producto gelificado

5. Desarrollo de Producto gelificado a partir de proteínas de suero... *163*
5.1. Introducción..... *163*
5.2. Efecto del ultrasonido y HHP en la gelificación..... *164*
5.2.1. Análisis de los geles 166
5.2.2. Capacidad de retención de agua 166
5.2.3. Comportamiento reológico..... 168
5.3. Análisis de microestructura por microscopía CRIO-SEM..... *173*
5.4. Análisis sensorial..... *176*
5.5. Análisis nutriional..... *179*
5.6. Análisis microbiológico *182*
5.7. Discusión y Conclusiones..... *182*

Conclusiones generales *185*

Bibliografía ……..…..……...*189*

Anexo estadístico.....203

Lista de figuras

Pág.

Figura 1-1 Evolución del modelo de micelas de caseína 6
Figura 1-2 Imagen de micela de caseína 8
Figura 1-3. Curva típica del análisis de textura Modificado de (Rosenthal, 1992) 27
Figura 1-4 Comportamiento reológico. 36
Figura 1-5 Modelos mecánicos de comportamiento visco elástico, ... 38
Figura 1-6 Diseño central compuesto para k=2 y k=3 40
Figura 1-7 Representación gráfica de una superficie de respuesta en tres dimensiones 41
Figura 1-8 Representación de la zona experimental para tres componentes 43
Figura 1-9 Visualización de resultados en software Desing expert® 45
Figura 2-1 Frutos maduros de curuba (*Pasiflora mollissima*) 51
Figura 2-2 Equipo de ultrasonido y su adaptación 53
Figura 2-3 Montaje para la coagulación 56
Figura 2-4 Moldes para quesos frescos 57
Figura 2-5 Curva de calibración BSA 58
Figura 2-6 Corte de probetas para análisis TPA 59
Figura 2-7 Utilización de la segunda derivada para identificar bandas y picos que componen una banda espectral. 64
Figura 3-1 Cuajada cortada y sinéresis 76
Figura 3-2 Contenido de nitrógeno en la cuajada a las condiciones de tratamiento 79
Figura 3-3 Perfil de textura (a) Blanco; (b) 200 MPa-30 min; (c) 400 Mpas-30 min; (d) 600 Mpa-30 min 82
Figura 3-4 Comportamiento de la dureza y la elasticidad con el tratamiento HPP 83
Figura 3-5 Comportamiento de la masticabilidad y la adhesividad con el tratamiento HPP 83
Figura 3-6 Comportamiento de la cohesividad y la gomosidad 84

Figura 3-7 Datos experimentales de contenido de agua *contra* actividad de agua a tres temperaturas 84
Figura 3-8 Ajuste de los datos experimentales y calculados por el modelo GAB a 15°C 86
Figura 3-9 Efecto de la temperatura sobre las Isotermas de adsorción..... 87
Figura 3-10 Efecto de la presión en las Isotermas de adsorción 88
Figura 3-11 Potencial Z de leche blanco 88
Figura 3-12 Potencial Z de leche tratada por HHP 600 MPa-30min 89
Figura 3-13 Distribución de tamaño de partícula en Leche sin tratamiento HHP..... 90
Figura 3-14 Distribución de tamaño comparado tratamiento 200MPa-15 y 30 min 91
Figura 3-15 Cambio en la opacidad de la leche con el tratamiento HHP..... 91
Figura 3-16 Distribución de tamaño leche tratada a 400 Mpa a15 min y 30 min 92
Figura 3-17 Distribución de tamaño de partícula en leche tratada a 600 MPa a 15 y 30 min..... 93
Figura 3-18 Grafico de correlación fluorescencia vs concentración de la proteína 94
Figura 3-19 Hidrofobicidad Suero tratado a 400MPa 95
Figura 3-20Comparación de espectros de leche no tratada-Blanco (azul) e tratada a 600 MPa-15min (rojo) 98
Figura 3-21 Segunda derivada de espectros de leche no tratada-Blanco (azul) y tratada a 600 MPa-15min (rojo) 98
Figura 3-22 Espectros de queso dializado manufacturados con: leche no tratada -Blanco (azul) y de leche tratada a 600 MPa-15min (rojo vivo) 99
Figura 3-23 Segunda derivada de espectros de quesos de leche no tratada-Blanco (azul) e tratada a 600 MPa-15min (rojo) 100
Figura 3-24 Espectro completo sueros sin dializar, Blanco (azul);600 MPa y 15 min(rojo) 101
Figura 3-25 Espectro de sueros dializados: suero de leche sin tratamiento (azul); suero de leche tratada a 400 Mpa -15 minutos (rojo oscuro); suero de leche tratada a 600 MPa – 15 min (rojo vivo). 101
Figura 3-26 Segunda derivada de los espectros de suero dializado: blanco (azul) 200-15 (verde); ,400-15 (rojo oscuro) y 600-15 (rojo)..... 102
Figura 3-27 Espectro de la correspondiente a la absorción de los grupos éster en la leche. Leche testigo (azul); 200 MPa-15 min (verde); 400 MPa-15 min (rojo oscuro); 600 MPa 15 min (rojo vivo). 103

Figura 3-28 Espectros en la zona espectral de absorción de los lípidos. Blanco (azul); 200 MPa-15min (verde); 400 MPa-15 min (rojo oscuro); 600 MPa- 15 min (rojo vivo). 104
Figura 3-29 (A) Microestructura de queso producido con leche pasteurizada, blanco LTST 80°C 20S; (B) Microestructura de queso con leche tratada a 600MPa-30min . 105
Figura 3-30 Sistema de corte de cuajada, tamaño del grano 107
Figura 3-31 Superficie de respuesta de rendimiento quesero 108
Figura 3-32 Superficie de respuesta del contenido de humedad en la cuajada..... 109
Figura 3-33 Superficie de respuesta del contenido de proteína en el suero. 110
Figura 3-34 Muestras de queso para análisis de textura 111
Figura 3-35 Comparativo dureza y Elasticidad de muestras tratadas por ultrasonido 111
Figura 3-36 Superficie de respuesta de la relación de las variables y la dureza..... 112
Figura 3-37 Superficie de respuesta para el efecto de ultrasonido sobre el color..... 114
Figura 3-38 Comparativo del tamaño medio de partícula de Leche sin tratamiento (A) y tratada 218 W y 6 min.(B) 115
Figura 3-39 Segunda derivada de los espectros de suero dializado: blanco (azul) 173W-1min (violeta); ,173W-6min (verde) y 173W-10min (rojo) 118
Figura 3-40 Segunda derivada de los espectros de suero dializado: blanco (azul) 173W-6min (violeta); 218-6min (rojo) y 173W-10min (verde) 119
Figura 3-41 (A) Microestructura de queso producido con leche pasteurizada, blanco LTST 80°C 20S; (B) Microestructura de queso con leche tratada a 173W-10min 120
Figura 4-1 Modelo de distribución de Weibull. Puntos: Datos Experimentales, Línea continua: Datos ajustados al modelo. Condiciones 200 MPa 20 min 131
Figura 4-2 Superficie de respuesta de la producción de ácido láctico 132
Figura 4-3 Comparativo del comportamiento reológico del blanco y tres tratamientos. 134
Figura 4-4 Modelo de Weltmann Curva azul: datos experimentales. Curva roja Esfuerzo Cortante ajustado al modelo de Weltmann. 135
Figura 4-5 Superficie de respuesta para el parámetro B del modelo de textura de Weltmann 136
Figura 4-6 Superficie de respuesta para el parámetro A del modelo de textura de Weltmanm 136
Figura 4-7 Perfil sensorial de dos muestras evaluadas por el panel, Formula 79-9-12 color naranja y 76-6-15 color azul. 140
Figura 4-8 Superficie de respuesta para el color 141
Figura 4-9 Superficie de respuesta para el sabor 142
Figura 4-10 Superficie de respuesta para el aroma 142

Figura 4-11 Superficie de respuesta para la textura..... 143
Figura 4-12 Superficie de respuesta para el atributo de Aceptación general..... 143
Figura 4-13 Deterioro de la aceptación sensorial de muestras almacenadas a 4°C.. 148
Figura 4-14 Deterior de los valores de pH de muestras almacenadas a 4°C 148
Figura 4-15 Evolución de los valores de acidez en muestras almacenadas a 4°C.... 149
Figura 4-16 Evolución de los valores de pH de muestras almacenadas a 4 y 25°C.. 149
Figura 4-17 Evolución de los valores de acidez de muestras almacenadas a 4 y 25°C 150
Figura 4-18 Deterioro de la aceptación sensorial de muestras almacenadas a 4 y 25°C 150
Figura 4-19 Grafica del comportamiento cinético de la Aceptación sensorial ajustados a 3 órdenes de reacción. 154
Figura 4-20 Grafico de Arrhenius para el pH; Muestra tratada HHP(A);Control (B) 155
Figura 4-21 Grafico de Arrhenius para la acidez; Muestra tratada HHP(A); Control (B)..... 156
Figura 4-22 Grafico de Arrhenius para la aceptación sensorial; Muestra tratada HHP(A); Control (B) 156
Figura 5-1 (A) Geles preparados a 400 MPa-15 min, (B) Geles preparados a 600 MPa - 15 min..... 167
Figura 5-2 Viscosidad compleja (η*)(♦) 600-5-CU, (¥) 600-15-CU (■) 600-15-SU 170
Figura 5-3 Efecto de la presión sobre G´y G´´ , (♦) 600-5-CU, (●) 400-5-CU 170
Figura 5-4 Efecto del tiempo sobre G´y G´´, (♦) 600-5-CU, (¥) 600-15-CU..... 171
Figura 5-5 Efecto ultrasonido sobre G´y G´´, (¥) 600-15-CU, (■) 600-15-SU 171
Figura 5-6 Imágenes de SEM de la microestructura de geles inducidos por presión (A,C,E) son geles de WPC y (B,D,F) son geles de WPI preparados a 400 MPa-15 min con pretratamiento de ultrasonido..... 175
Figura 5-7 Agregados de caseína en Gel de WPC con pretratamiento de ultrasonido 176
Figura 5-8 Perfil sensorial de geles WPI producidos por HHP 178
Figura 5-9 Perfil sensorial de geles WPC producidos por HHP..... 178
Figura 5-10 Comparativo muestra mejor calificada 400 Mpa-15 min y 600Mpa-15 min..... 179
Figura 5-11 Etiqueta nutricional para los geles según Norma NTC 512-2..... 181

Lista de tablas

Pág.

Tabla 1.2-1 Composición promedio de las proteínas de la leche 4
Tabla 1.2-2 Contenido de vitaminas de la leche fresca 13
Tabla 1.2-3 Contenido de minerales de la leche fresca..... 15
Tabla 1.3-1 Susceptibilidad de las proteínas de leche 22
Tabla 1.4-1 Parámetros de textura calculados a partir del grafico..... 27
Tabla 1.4-2 Bandas características del enlace peptídico 30
Tabla 1.4-3 Bandas de vibración con valor diagnóstico para estudios FTMIR de proteínas..... 31
Tabla 1.4-4 Asignación de estructuras secundarias en banda Amida I (usando desconvolución)..... 32
Tabla 1.4-5 Modelos Reológicos..... 37
Tabla 1.5-1 Modelos canónicos (Montogomery, 2004)..... 44
Tabla 1.5-2 Algunos modelos usados en ese trabajo..... 46
Tabla 2.1-1. Composición leche semidescremada..... 50
Tabla 2.3-1 Asignación de estructuras secundarias en rangos de longitud de onda en cm^{-1} para la región Amida I 64
Tabla 3.2-1 Diseño experimental factorial para la ejecución de los experimentos..... 76
Tabla 3.2-2 Comparativo del rendimiento quesero a las condiciones de tratamiento HHP 77
Tabla 3.2-3 Contenido de humedad de la cuajada de leche bajo distintas condiciones de P (MPa) y T (min) 79
Tabla 3.2-4 Contenido de Nitrógeno en el suero bajo condiciones de HPP(200-600 MPa y 15-30 min)..... 80
Tabla 3.2-5 Parámetros de textura a las condiciones del estudio 82
Tabla 3.3-1 Parámetros del modelo de GAB a 15°C..... 85
Tabla 3.3-2 Parámetros del modelo de GAB a 25°C..... 85
Tabla 3.3-3 Parámetros del modelo de GAB a 40°C..... 86
Tabla 3.3-4 Valores de calor isostérico a diferentes presiones de tratamiento..... 89

Tabla 3.5-1 Resultados de H_o para muestras de leche tratadas por HHP 95
Tabla 3.5-2 Resultados de H_o para muestras de suero tratadas por HHP..... 96
Tabla 3.5-3 Resultados de H_o para muestras de Caseína tratadas por HHP 96
Tabla 3.8-1 Diseño experimental para el tratamiento de ultrasonido..... 106
Tabla 3.8-2 Efecto del tratamiento de ultrasonido sobre el cambio de color..... 114
Tabla 3.8-3 Tamaño de partícula y potencial Z de muestras tratadas por ultrasonido 115
Tabla 3.8-4 Resultados de hidrofobicidad superficial de muestras tratadas por ultrasonido 116
Tabla 3.8-5 Comportamiento del pH en muestras tratadas por ultrasonido..... 117
Tabla 4.2-1 Parámetros del modelo de Weibull..... 129
Tabla 4.2-2 Parámetros del modelo de Weltman 133
Tabla 4.3-1Proporciones de componentes para el triángulo de mezcla 138
Tabla 4.3-2 Muestra de cálculo de los datos obtenidos de un panel de evaluación .. 139
Tabla 4.3-3 Resultados generales de la evaluación sensorial de quesos tipo *petit suiss* 141
Tabla 4.4-1 Chi cuadrado (X^2) calculado para los panelistas 145
Tabla 4.4-2 Descriptores del perfil sensorial de queso *Petit suisse* saborizado con curuba (*Pasiflora mollisima*)..... 146
Tabla 4.4-3 Parámetros fisicoquímicos de las muestras almacenadas 147
Tabla 4.4-4 Ecuaciones de regresión para la Aceptación sensorial en cinética de orden cero 151
Tabla 4.4-5 Ecuaciones de regresión para la Aceptación sensorial en cinética de primer orden 152
Tabla 4.4-6 Ecuaciones de regresión para la Aceptación sensorial en cinética de segundo orden..... 152
Tabla 4.4-7 Valores de las constantes cinéticas y el ajuste..... 154
Tabla 4.4-8 Energía de activación del deterioro de los atributos pH, acidez y aceptación sensorial. 156
Tabla 4.4-9 Ejemplo de cálculo de calificación global 157
Tabla 4.4-10 Predicción de la vida útil sensorial 157
Tabla 5.2-1 Diseño experimental para la ejecución de los experimentos 164
Tabla 5.2-2 Formulaciones de mezclas WPC y WPI..... 165
Tabla 5.2-3 Datos de capacidad de retención de agua 167
Tabla 5.2-4 Modulo elástico (G´), Modulo viscoso (G´´) y Modulo complejo (G*) para geles de WPI (ω= 1 rad/seg). 169

Tabla 5.2-5 Modulo elástico (G´), Modulo viscoso (G´´) y Modulo complejo (G*) para geles de WPC (ω= 1 rad/seg). 169
Tabla 5.2-6 Parámetros del modelo reológico para geles de WPC 172
Tabla 5.2-7 Parámetros del modelo reológico para geles de WPI 173
Tabla 5.4-1 Resultado evaluación geles WPI 177
Tabla 5.5-1 Aporte de aminoácidos del gel de WPC 181
Tabla 5.6-1 Recuento microbiano de muestras de Geles WPC y WPI 182

Lista de símbolos y abreviaturas

ANS	1–anilinonaftaleno–8–sulfonato
α-La	α-lactoalbúmina
β−Lg	β-lactoglobulina
BSA	Seroalbúmina bovina
CCP	Fosfato cálcico coloidal
CN	Caseína
Cys	Cisteína
FTMIR	Infrarrojo medio con transformada de Fourier
HHP	High hydrostatic pressure
Ho	Hidrofobicidad superficial
IgA	Inmunoglobulina A
Igs	Inmunoglobulinas
LSD	Test de la menor diferencia significativa
PRODAM	6-propionil-2- (N,N-dimetil amino)naftaleno
SD	Desviación estándar
UP	Ultrasonido de potencia
W	Potencia sonora en Watts
WPC	Whey protein concentrate
WPI	Whey protein isolate

Objetivos y Descripción de la Tesis

Contexto

Colombia es un país de fuerte vocación agroindustrial, con un crecimiento sostenido del 7% en los últimos 3 años en el sector de la producción y transformación de alimentos, pero con una muy limitada innovación de sus procesos tecnológicos.

Para mejorar la competitividad del país se han formulado políticas, sobre transformación productiva, que tiene que ver con impulsar la transformación de la economía del país hacia una estructura de oferta diversificada, sostenible, de alto valor agregado y sofisticación que promueva su adecuada inserción en los mercados globalizados y contribuya al mejoramiento de la calidad de vida y el bienestar de los habitantes.

En este orden de ideas es necesaria la formación de capital humano que pueda promover por la vía de la transferencia tecnológica la modernización de los procesos productivos a nivel nacional.

Este trabajo doctoral se integra en el programa de formación de docentes de la Universidad Jorge Tadeo Lozano, Seccional Bogotá, Colombia y fue realizado al abrigo del Acuerdo existente entre esta Universidad y la Universidade de Aveiro.

La Universidad Jorge Tadeo Lozano se hizo cargo del pago de mis propinas durante 3 años, de los pasajes aéreos y sostenimiento, además me permitió acumular mi servicio docente, para viajar a Aveiro dos veces por año en periodos de tres meses para el desarrollo del componente experimental especialmente en lo relacionado con el equipo de altas presiones hidrostáticas.

El desarrollo de este trabajo forma parte de mi formación académica y como un ejercicio estructurado de investigación, que he podido proyectar también en mi actividad de apoyo a las industrias del sector alimentario, dentro de las tareas de extensión de la universidad y a través de la cual se ha atendido la necesidad de investigación en la tecnología de altas presiones hidrostáticas para empresas como Alpina Colombia (Alpina Productos Alimenticios S.A. Sopó, Colombia) para la que se evaluó la tecnología en el desarrollo de bebidas a base de fruta, y para la empresa Productos del Campo San Gregorio (San Gregorio S.A.S, Bogotá, Colombia) que adquirió e instalo el primer equipo de alta presión en el país en el año 2018 y para los cuales se ha desarrollado un trabajo de validación de condiciones de proceso y modelado de la vida útil en un alimento de origen vegetal que se exporta.

Objetivos

El objetivo general de esta tesis doctoral fue el estudio de las modificaciones en la estructura de las proteínas de la leche, por la aplicación de las tecnologías de alta presión hidrostática y ultrasonido, para aprovechar los cambios en la funcionalidad tecnológica de las proteínas en el desarrollo de productos.

- Comprender las modificaciones en las interacciones proteína - proteína y proteína-agua, por la aplicación de metodologías analíticas para la comprensión de los cambios estructurales de las proteínas y aprender las técnicas analíticas.
- Aplicar modelos matemáticos para explicar los efectos de la aplicación de las tecnologías HHP y UP, en el desempeño funcional, tales como la capacidad de adsorción de agua, la velocidad de fermentación y el comportamiento reológico
- Aplicar diseños experimentales robustos para el desarrollo de productos y la evaluación de la aceptación sensorial y la vida útil

Descripción del documento

La tesis está organizada en 5 capítulos, el **Capítulo 1** describe el estado del arte, en lo relacionado con la estructura y funcionalidad de las proteínas de leche, los estudios relacionados con el efecto de la aplicación de las tecnologías de HHP y UP, en las proteínas, las principales metodologías analíticas empleadas en el estudio, además de las herramientas matemáticas y estadísticas pertinentes.

El **Capítulo 2** describe los materiales, equipos y metodologías usadas para el desarrollo de todo el trabajo experimental, así como las herramientas estadísticas para el diseño experimental y los modelos cinéticos de evaluación.

El **Capítulo 3** recoge los resultados de la aplicación de las tecnologías, asociados a la coagulación en la producción de queso fresco y suero dulce, medidos a través de técnicas instrumentales como FTMIR, para el estudio de los cambios a nivel de la estructura secundaria de las proteínas, estudio de microestructura por SEM, medición de la hidrofobicidad superficial por fluorescencia y el modelado matemático de las isotermas de adsorción. Estos resultados permitieron definir las condiciones de trabajo para el desarrollo de productos que se describen en los capítulos 4 y 5.

El **Capítulo 4** describe el desarrollo de un producto fermentado fabricado a partir de leche tratada con HHP, el efecto de la aplicación de la tecnología en la cinética de fermentación, el comportamiento reológico y la aceptación sensorial, evaluados

mediante la aplicación de modelos matemáticos y estadísticos, así como la determinación de la vida útil por la aplicación de modelos cinéticos.

En el **Capítulo 5** se propone el desarrollo de un producto gelificado que aprovecha las proteínas del suero, usando como medio de gelificación la aplicación combinada de las tecnologías de ultrasonido y alta presión, se evalúa el comportamiento reológico y su relación con la aceptación sensorial y se propone una formulación, las condiciones de proceso que permiten el producto de mayor aceptación sensorial, así como sus características nutricionales.

Finalmente se presentan unas conclusiones generales, que permiten prever la aplicación de las tecnologías estudiadas para el desarrollo de productos con características sensoriales, funcionales y probablemente nutricionales mejoradas.

CAPÍTULO 1- Revisión Bibliográfica

Estructura y funcionalidad de las proteínas de la leche

1.1.1 Generalidades de las proteínas

La estructura primaria de las proteínas consiste en una cadena poli peptídica de residuos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, que también pueden estar entrecruzados por puentes disulfuro. La estructura básica de los aminoácidos que componen las proteínas está integrada por un carbono alfa ligado a un átomo de hidrógeno, un grupo amino, un grupo carboxilo y una cadena lateral llamada grupo R. La existencia del grupo R es la que proporciona a la proteína sus propiedades fisicoquímicas, así como determina el grado o número de puentes de hidrógeno y la reactividad, ya que, según estas cadenas laterales y su interacción con el agua, los aminoácidos pueden ser hidrófobos o hidrófilos (Damodaran, Parkin, & Fennema, 2008).

La organización tridimensional de las proteínas, o conformación, también involucra estructuras secundarias, terciarias y cuaternarias. La estructura secundaria se refiere a la disposición espacial de los residuos de aminoácidos que están cerca uno del otro en la secuencia lineal. La alfa-hélice y el ß-plegada son ejemplos de estructuras secundarias que surgen de relaciones estéricas regulares y periódicas. La estructura terciaria se refiere a la disposición espacial de los residuos de aminoácidos que están muy alejados en la secuencia lineal, dando lugar a un mayor enrollamiento y plegado. Si la proteína está estrechamente enrollada y doblada en una forma algo esférica, se llama proteína globular, si la proteína consiste en largas cadenas poli peptídicas que están intermolecularmente unidas, se les llama proteínas fibrosas. La estructura cuaternaria se produce cuando se asocian proteínas con dos o más subunidades de cadena polipeptídica (Nakai & Modler, 1996).

1.1.2 Funciones de las proteínas en los alimentos

Las funciones típicas de las proteínas alimentarias incluyen, la gelificación, emulsificación, espumado, textura, absorción de agua, adhesión y cohesión, y absorción y retención de lípidos y flavor. Las propiedades funcionales están relacionadas con las propiedades físicas, químicas y estructurales intrínsecas de las proteínas, incluyendo tamaño, forma, composición y secuencia de aminoácidos, carga neta y distribución de las cargas y relación hidrofobicidad/hidrofilicidad (Damodaran et al., 2008).

Particularmente están definidas por la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria, las uniones inter e intramoleculares, principalmente uniones disulfuro, la rigidez/flexibilidad molecular en respuesta a los cambios de las condiciones ambientales

y la naturaleza y la extensión de las interacciones con otros componentes. Por lo tanto, la comprensión de las propiedades físicas, químicas y funcionales de las proteínas y los cambios que sufren estas propiedades durante el procesamiento es esencial para comprender el comportamiento de las proteínas en los alimentos (Damodaran et al., 2008).

1.1.3 Proteínas lácteas

El contenido de nitrógeno de la leche se distribuye entre las caseínas (75%), las proteínas de suero (18%), las proteínas diversas (2%) y el nitrógeno no proteico (5%).

1.1.4 Caseínas

Las caseínas son un conjunto de fracciones de proteína que representan alrededor del 80% de las proteínas de la leche, las principales fracciones de caseína son α_{s1}-caseína, α_{s2}-caseína, β-caseína y κ-caseína, todas las caseínas son proteínas conjugadas, la mayoría con grupos de fosfato esterificados a residuos de serina, estos grupos fosfato son importantes para la estructura de la micela de caseína. La unión de calcio por las caseínas individuales es proporcional al contenido de fosfato (Rasmussen et al., 1999). En la Tabla 1.2-1. se puede ver que las caseínas son las proteínas mayoritarias en la composición total de la leche.

Tabla 1.2-1 Composición promedio de las proteínas de la leche

Componente	*g/L*	*% de la proteína total*
Proteína total	33,0	100
Caseinas totales	**26,0**	**78,8**
α_{s1}-caseína	10.7	32,4
α_{s2}-caseína	2.8	8,5
β-caseína	8.6	26,1
κ-caseína	3.1	9,4
γ-caseínas	0.8	2,4
Proteinas totales del suero	**6.4**	**19,4**
alfa lactoalbumina	1.2	3,6
beta lactoglobulina	3.2	9,8
BSA	0.4	1,2
inmunogloblinas	0.8	2,4
proteasas	0.8	2,4
miscelaneos	0.6	1,8

Adaptado: (Ferrandini, Castillo, López, & Laencina, 2008)

La conformación de las caseínas es muy similar a la de las proteínas globulares desnaturalizadas. El alto número de residuos de prolina en las caseínas provoca una flexión particular de la cadena e inhibe la formación de estructuras secundarias ordenadas y compactas y debido a que las caseínas no contienen enlaces disulfuro falta la estructura terciaria, lo que explica la estabilidad de las caseínas frente a la desnaturalización por calor porque hay muy poca estructura que desordenar. Sin una estructura terciaria hay una exposición considerable de residuos hidrófobos, lo que produce fuertes reacciones de asociación de las caseínas y las hace insolubles en agua (Rasmussen et al., 1999).

- Caseína alfa (s1): posee dos regiones hidrófobas, que contienen todos los residuos de prolina, separados por una región polar, que contiene siete de los ocho grupos fosfato. Puede precipitarse a muy bajos niveles de calcio, tiene un peso molecular de 23,000; 199 residuos y 17 residuos de prolina.
- Caseína alfa (s2): muestra las cargas negativas concentradas cerca N terminal y las cargas positivas cerca del C terminal, puede precipitarse a niveles muy bajos de calcio, tiene un peso molecular de 25,000; 207 residuos y 10 prolinas.
- Beta-caseína: Es una proteína muy anfifílica, actúa como una molécula de detergente ya que posee una región N-terminal altamente cargada y una región C-terminal hidrófoba. La auto asociación depende de la temperatura; formarán grandes polímeros a 20°C, pero no a 4°C, es menos sensible a la precipitación de calcio, tiene un peso molecular de 24,000; 209 residuos y 35 prolinas.
- Kappa-caseína: Es una proteína muy resistente a la precipitación por calcio, estabilizando a otras caseínas. La rotura por la enzima renina en el enlace Phe105-Met106 elimina la capacidad de estabilización, dejando una porción hidrofóbica, denominada para-kappa-caseína y una porción hidrófila llamada kappa-caseína gluco macro péptido (GMP) o caseíno macro péptido (CMP), tiene un peso molecular 19,000; 169 residuos y 20 prolinas.
- Gamma caseína: Es un conjunto de fragmentos de la caseína β formados por la acción de la plasmina, una proteasa presente en la leche. En condiciones normales, esta caseína representa alrededor del 3% del total de caseínas. Los fragmentos de caseína β más pequeños formados en este proceso proteolítico quedan en el lacto suero (Ferrandini et al., 2008).

1.1.4.1 Estructura de la micela de las caseínas

La mayor parte de las proteínas de caseína existen en forma de partículas coloidales conocidas como micela de caseína. Su función biológica es el transporte de fosfato de calcio en la dieta de mamíferos jóvenes. Además de la proteína de la caseína, el calcio y el fosfato, la micela también contiene citrato, iones menores, lipasa y enzima plasmina, y suero de leche atrapado. Estas micelas son estructuras porosas, que ocupan aproximadamente 4 ml / g y 6-12% del volumen total de la fracción de leche, el tamaño varía de 50 a 250 nm de diámetro (Ferrandini et al., 2008).

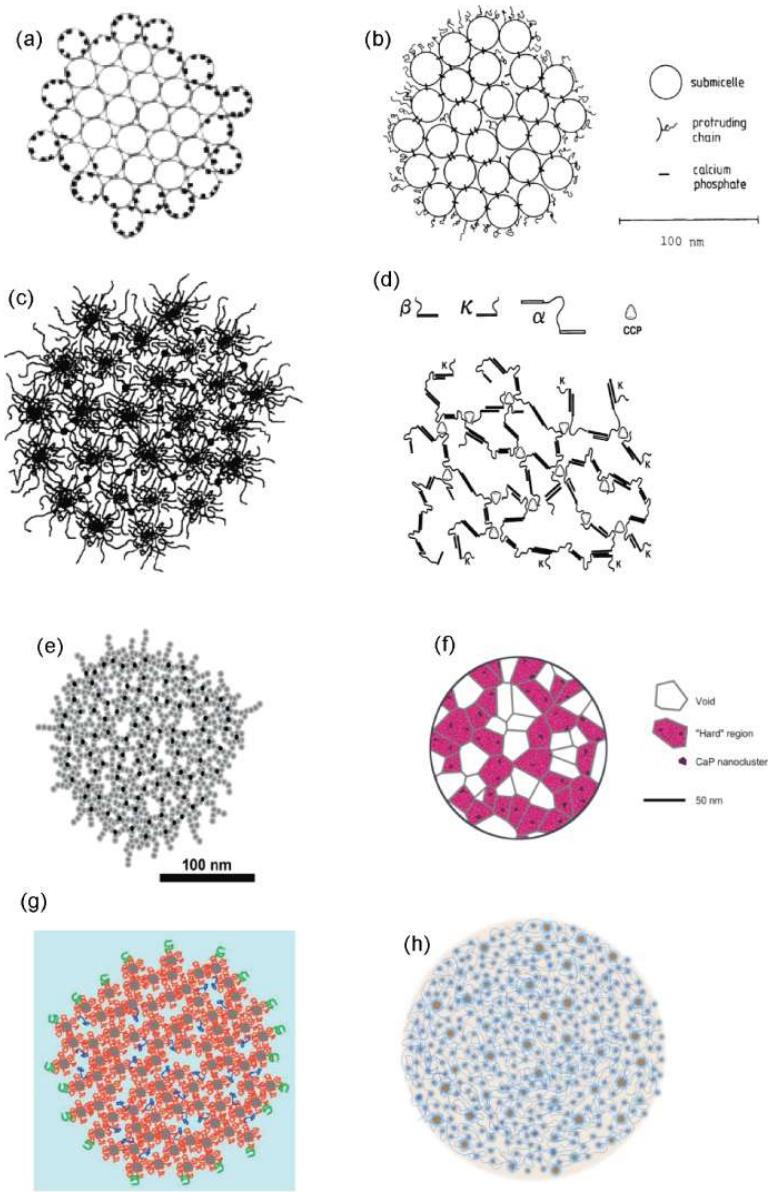


Figura 1-1 Evolución del modelo de micelas de caseína
Disponible en : https://dairyprocessinghandbook.com/chapter/chemistry-milk

Para comprender la estructura, se han desarrollado muchos modelos basados en la composición y reactividad (Rasmussen et al., 1999). La figura 1-1 permite compara los distintos modelos propuestos y su evolución, el modelo de sub micelas propuesto por Schmidt (a) y Walstra (b) en el que los grupos de fosfato de calcio actúan como un pegamento supramolecular para mantener juntas las sub-micelas (c) El modelo Holt de micelas de caseína caracterizadas por cadenas de caseína altamente hidratadas y plegadas que se unen a los nanoclústers de fosfato de calcio (d) El modelo de caseína de Horne con interacciones específicas entre los diferentes componentes de la caseína y los nanoclúster de calcio (e) El modelo fractal de McMahon y Oommen (f) El modelo de esponja de Cabane y colaboradores (g) El modelo estructural de micelas de caseína altamente hidratado propuesto por Dalgleish con nanocanales de agua (h) La estructura de red de bobina aleatoria de micelas de caseína con nanoclústers de fosfato de calcio dispersos dentro, según lo propuesto por Kruif *et* al.

Los últimos modelos proponen una estructura compuesta por agregados de proteínas alrededor de los nanocomponentes de fosfato de calcio. Con proteínas interactuando con el fosfato de calcio o con otras caseínas de formas diferentes dando lugar a los agregados. Los nanoclústers proporcionan regiones de mayor o menor densidad. La estructura contiene una cantidad importante de agua, la superficie, e incluso parte del interior, es reactiva a otras sustancias. La k-caseína está presente principalmente como una capa estabilizadora alrededor del exterior de la micela en todos los modelos propuestos Figura 1.2 (Dalgleish, 2011).

1.1.4.2 Estabilidad de las caseínas

Como ancla de las sub micelas que forman la micela de caseína se encuentra el fosfato de calcio coloidal (PCC) mediante uniones covalentes o electrostáticas. La kappa-caseína se ubica en una posición superficial en las sub micelas ricas en esta, mientras que las que tienen menos están en el interior. Esto produce una “capa peluda”, con un grosor de al menos 7 nm, que actúa como barrera estérica para impedir la agregación adicional de las sub micelas. Las micelas de caseína mantienen equilibrios dinámicos entre la micela y sus alrededores, como el equilibrio entre las moléculas libres de caseína y sub micelas; las sub micelas y micelas libres; el calcio coloidal disuelto y el fosfato. (Horne, 2009)

Se deben considerar muchos factores al evaluar la estabilidad de la micela de caseína, en primer lugar, está el papel de Ca^{++}, pues más del 90% del contenido de calcio de la leche descremada está asociado de alguna manera u otra con la micela de

caseína. La eliminación de Ca^{++} conduce a una disociación reversible de ß -caseína sin desintegración de la micela y la adición de Ca^{++} conduce a la agregación (Horne, 2009).

Por otra parte, están también los puentes de H, que se dan entre las caseínas individuales en la micela, pero realmente son pocos, porque no hay una estructura secundaria en las proteínas de la caseína. Además están, los enlaces disulfuro pero también resultan insuficientes porque, por ejemplo las alfa (s1) y las ß-caseínas no tienen ningún residuo de cisteína (Leman & Kinsella, 1989).

La Figura 1-2 muestra la micela de caseína como una estructura sólida y esponjosa dispersa en un medio acuoso y que presenta un diámetro medio de 120 nm.

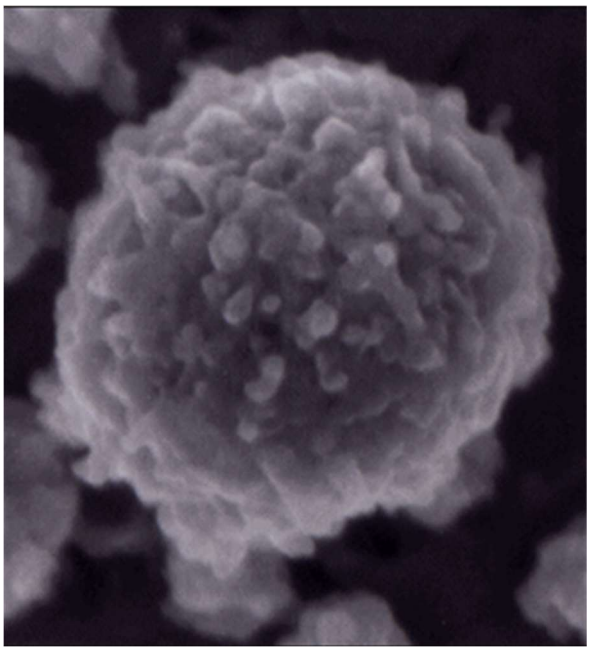


Figura 1-2 Imagen de micela de caseína.
(Dalgleish, Spagnuolo, & Golf, 2004)

Las caseínas son proteínas hidrófobas es decir que contienen muchos aminoácidos con cadenas laterales no polares y esto podría desempeñar un papel en la estabilidad de la micela. Algunas de las interacciones de las subunidades pueden ser el resultado de la unión iónica, pero la estructura de la micela en general está muy suelta y abierta y como ya se dijo la capa peluda interfiere siendo un impedimento estérico entre las partículas (Dalgleish, 2011).

Hay varios factores que afectarán la estabilidad del sistema de micelas de caseína como por ejemplo el equilibrio mineral, ya que el contenido en sal, afecta la actividad del calcio en el suero y el contenido de fosfato de calcio de las micelas. La reducción del pH conduce a la disolución del fosfato de calcio hasta que, en el punto isoeléctrico (pH 4,6), se disuelve todo el fosfato y precipitan las caseínas (Thompson, 2014).

Factores físicos como la temperatura, tienen también efecto en la estabilidad de las micelas, por ejemplo, a 4°C, la beta-caseína comienza a disociarse de la micela, a 0°C, no hay agregación y la congelación produce un precipitado llamado crio-caseína.

Bajo diferentes condiciones el procesamiento tal como el tratamiento térmico o la aplicación de tecnologías no térmicas de conservación se ocasionan alteraciones especialmente a nivel de las proteínas del suero que se adsorben y alteran el comportamiento de la micela. Cuando dos o más de estos factores se aplican juntos, el efecto también puede ser aditivo (Anema, 2014).

1.1.4.3 Agregación de micelas de caseína

Aunque la micela de caseína es bastante estable, hay cuatro formas principales en que se puede inducir la agregación:

- La quimosina o cuajo y otras enzimas proteolíticas, se usa para la coagulación. En la primera etapa el cuajo rompe el enlace Phe (105) -Met (106) de la kappa-caseína, lo que resulta en la formación de la CMP soluble que se difunde de la micela y la para-kappa-caseína, un péptido hidrófobo que permanece en la micela. En una segunda etapa, las micelas se agregan, debido a la pérdida de la repulsión estérica de la kappa-caseína, así como a la pérdida de la repulsión electrostática debido a la disminución del pH. A medida que el pH se acerca a su punto isoeléctrico (pH 4,6), las caseínas se agregan. Las micelas de caseína también tienen una fuerte tendencia a agregarse debido a las interacciones hidrófobas. El calcio ayuda a la coagulación creando condiciones isoeléctricas y actuando como un puente entre las micelas. La temperatura en el momento de la coagulación es muy importante para las etapas primaria y secundaria. Durante la etapa secundaria, las temperaturas elevadas aumentan la reacción hidrófoba. La etapa terciaria de la coagulación implica el reordenamiento de las micelas después de que se haya formado un gel. Hay una pérdida de paracaseína a medida que la leche se calienta y comienza la sinéresis (Walstra, Geurts, Noomen, Jellema, & Van Boekel, 2001)
- La acidificación hace que las micelas de caseína se desestabilicen o agreguen al disminuir su carga eléctrica a la del punto isoeléctrico. Al mismo tiempo, la acidez del medio aumenta la solubilidad de los minerales para que el calcio orgánico y el fósforo contenidos en la micela se vuelvan gradualmente solubles en la fase acuosa. Las micelas de caseína se desintegran y la caseína precipita.

La agregación se produce como resultado de interacciones hidrófobas impulsadas por vía entrópica. (Lucey, 2009)

- A temperaturas superiores al punto de ebullición, las micelas de caseína se agregarán irreversiblemente. Al calentar, la capacidad del tampón de las sales de leche cambia, se libera dióxido de carbono, se producen ácidos orgánicos y el fosfato tricálcico y el fosfato de caseína pueden precipitarse con la liberación de iones de hidrógeno (Considine, Patel, Anema, Singh, & Creamer, 2007).
- La gelificación por envejecimiento es un fenómeno de agregación que afecta a los productos lácteos esterilizados, como la leche concentrada y los productos lácteos UHT. Después de semanas o meses de almacenamiento, hay un aumento en la viscosidad acompañado por una gelificación visible y una agregación irreversible de las micelas en largas cadenas que forman una red tridimensional. Se cree que puede deberse a la separación proteolítica de la caseína por la enzima plasmina bacteriana o nativa que es resistente al tratamiento térmico y puede llevar a la formación de un gel lento que se forma durante un largo período de tiempo, también a reacciones químicas de polimerización de caseína y proteínas de suero del tipo Maillard y otras reacciones químicas y a la formación de complejos kappa-caseína-β-lacto globulina (Lucey, 2009).

1.1.5 Proteínas de suero

Las proteínas que aparecen en el sobrenadante de la leche después de la precipitación de las caseínas, se denominan colectivamente proteínas de suero. Estas proteínas globulares son más solubles en agua que las caseínas y están sujetas a desnaturalización por calor. Las proteínas de suero nativas tienen buenas propiedades de gelificación y batido y con la desnaturalización aumenta su capacidad de retención de agua. Las principales fracciones son la β-Lacto globulina, la alfa-Lacto albúmina, la albúmina de suero bovino (BSA) y las inmunoglobulinas (Ig) (Anema, 2014).

- ß-Lacto globulinas: (MW - 18,000; 162 residuos) Este grupo, que incluye ocho variantes genéticas, comprende aproximadamente la mitad del total de proteínas de suero. La β-Lacto globulina tiene dos enlaces disulfuro internos y un grupo tiol libre. La conformación incluye una estructura secundaria considerable y existe naturalmente como un dímero unido no covalente. En el punto isoeléctrico

(pH 3,5 a 5,2), los dímeros se asocian además con octámeros, pero a un pH inferior a 3,4, se disocian en monómeros (Damodaran et al., 2008).

- alfa-Lacto albumina: (MW - 14,000; 123 residuos) Estas proteínas contienen ocho grupos de cisteína, todos involucrados en enlaces disulfuro internos, y cuatro residuos de triptófano. La alfa-Lacto albumina tiene una estructura secundaria altamente ordenada y una estructura terciaria esférica y compacta. La desnaturalización térmica y el pH<4.0 dan como resultado la liberación de calcio (Damodaran et al., 2008).

El tipo de suero y su composición dependen del método utilizado durante la remoción de la caseína. El suero de queso es un co producto obtenido durante la elaboración del queso, el suero ácido se obtiene por separación de las caseínas por acidificación directa y está compuesto por β–Lacto globulina, caseinoglicomacropéptido y polisacáridos en coloides alimentarios.

Durante el clivaje de la κ–caseína en el proceso de elaboración del queso se forman además diferentes péptidos, entre ellos el caseinoglicomacropéptido (CMP) que no se encuentra naturalmente en la leche, pero sí en el suero de queso.

Para el aprovechamiento del suero como materia prima se aplican varios procesos tecnológicos, siendo el más común es la deshidratación, para obtener suero en polvo o concentrados de proteína de suero (WPC por sus siglas en inglés, “whey protein concentrates”). En el primer caso el suero es deshidratado directamente, mientras que en el segundo el suero es previamente enriquecido en proteína, eliminando componentes como sales y lactosa mediante tecnología de membrana.

La tecnología de membranas y el desarrollo de procesos como la ultrafiltración y la nanofiltración han permitido ampliar el tipo de productos derivados del suero al separar las proteínas del suero de la lactosa, para producir WPC desde 35 a 85 % de pureza. Durante el proceso de ultrafiltración las proteínas del suero no se desnaturalizan, por lo que sus propiedades funcionales permanecen intactas. Entre los productos proteicos del suero, además de los concentrados con distintas proporciones de proteína, también se encuentran los aislados de proteínas (WPI por sus siglas en inglés, “whey protein isolates”) y proteínas aislados como la α–lacto albúmina, β–lacto globulina, lactoferrina y otras inmunoglobulinas (Anema, 2014).

1.1.6 Otros componentes de la leche

1.1.6.1 Enzimas

Las enzimas son un grupo de proteínas que tienen la capacidad de catalizar reacciones químicas y aceleran la velocidad de tales reacciones. La acción de las enzimas es muy específica. La leche contiene tanto enzimas nativas como exógenas. Las enzimas exógenas consisten principalmente en enzimas termoestables producidas por bacterias psicrotróficas: lipasas y proteasas. Hay muchas enzimas nativas que han sido aisladas de la leche. El grupo más significativo son las hidrolasas:

- Lipoproteína lipasa (LPL): una enzima lipasa divide las grasas en glicerol y ácidos grasos libres. Esta enzima se encuentra principalmente en el plasma en asociación con micelas de caseína. La grasa láctea está protegida de su acción por la membrana del glóbulo graso (MGF). Si se ha dañado la MGF, o si existen ciertos cofactores (lipoproteínas del suero sanguíneo), la LPL puede atacar las lipoproteínas de la membrana y causar la lipolisis.
- Plasmina: la plasmina es una enzima proteolítica; ataca tanto a la caseína ß como a la caseína αs1, es muy estable al calor y responsable del desarrollo de la amargura en la leche pasteurizada y en la leche procesada UHT. También puede desempeñar un papel en la maduración y el desarrollo del sabor de ciertos quesos, como el queso suizo.
- Fosfatasa alcalina: las enzimas fosfatasa son capaces de dividir los ésteres específicos del ácido fosfórico en ácido fosfórico y los alcoholes relacionados, a diferencia de la mayoría de las enzimas de la leche, tiene un pH y temperatura óptimos que difieren de los valores fisiológicos; pH de 9.8. La enzima se destruye con temperaturas mínimas de pasteurización, por lo tanto, se puede realizar una prueba de fosfatasa para asegurar una pasteurización adecuada.
- Lactoperoxidasa, enzima natural presente en la leche cruda, cataliza la reacción química del tiocianato, que también se encuentra de manera natural en la leche, en presencia de peróxido de hidrógeno. El producto resultante tiene un efecto bacteriostático en la mayoría de las bacterias, e incluso un efecto bactericida en algunas de ellas, como por ejemplo *Escherichia coli*. El sistema de la lacto peróxidasa (sistema LP) pertenece a un grupo de agentes bacteriostáticos que pueden tener efectos beneficiosos en la elaboración de la leche, prolongando su conservación (Karoui et al., 2006).

1.1.6.2 Lactosa

La lactosa es un disacárido (2 azúcares) compuesto de glucosa y galactosa, debido al carbono anomérico, la lactosa puede existir como dos isómeros, alfa o beta, comprende 4,8 a 5,2% de leche, 52% de la leche deshidratada y 70% de sólidos de suero. No es tan dulce como la sacarosa; cuando la lactosa se hidroliza con ß-D-galactosidasa (lactasa), una enzima que divide estos monosacáridos, el resultado es un aumento del dulzor y la disminución del punto de congelación. Una de sus funciones más importantes es su utilización como sustrato de fermentación de las bacterias acido lácteas que producen ácido láctico a partir de la lactosa, que es el comienzo de muchos productos lácteos fermentados (Thompson, 2014).

La cristalización de la lactosa da como resultado un defecto llamado arenoso, debido a la presencia de estos cristales afilados en la lengua. La lactosa es relativamente insoluble, lo cual es un problema en muchos productos lácteos, especialmente en los helados y la leche condensada azucarada. Además de la lactosa, la leche fresca contiene otros carbohidratos en pequeñas cantidades, que incluyen glucosa, galactosa y oligosacáridos (Damodaran et al., 2008).

1.1.6.3 Vitaminas

Las vitaminas son sustancias orgánicas esenciales para muchos procesos vitales. La leche incluye vitaminas A, D, E y K. solubles en grasa. La vitamina A se deriva del retinol y del ß-caroteno. Debido a que la leche es una fuente importante de vitamina A en la dieta, se requiere que los productos reducidos en grasa que han perdido la vitamina A con la grasa complementen el producto con vitamina A. También hay una pequeña cantidad de vitamina C (ácido ascórbico) presente en la leche cruda, pero es una cantidad insignificante en relación con las necesidades humanas y es bastante lábil al calor: alrededor del 20% se destruye con la pasteurización (Damodaran et al., 2008).

La tabla 1-2-2 muestra el contenido promedio de vitaminas en la leche fresca, el aporte de vitamina A corresponde aproximadamente al 4% de las necesidades diarias de un adulto.

Tabla 1.2-2 Contenido de vitaminas de la leche fresca

Vitaminas	*contenido/L*	*unidades*
A	400	ug RE
D	40	IU
E	1000	ug
K	50	ug
B1	450	ug
Niacina	1750	ug
B6	900	ug
Acido Pantotenico	500	ug
Biotina	3500	ug
Acido Folico	35	ug
B12	55	ug
C	4,5	ug

Adaptado: (Damodaran et al., 2008)

1.1.6.4 Minerales

Los minerales presentes en la leche incluyen tres familias de sales: Sodio (Na), potasio (K) y cloruro (Cl): estos iones libres se correlacionan negativamente con la lactosa para mantener el equilibrio osmótico de la leche con la sangre.

El contenido mineral de la leche fresca muestra un amplio rango, tal como se puede ver en la tabla 1.2-3 esta variación se asocia a la variabilidad relacionada con factores internos tales como la lacto génesis en la célula secretora de animales individuales y externos, aquéllos asociados a la alimentación, el clima o el contenido de contaminantes (Damodaran et al., 2008).

Tabla 1.2-3 Contenido de minerales de la leche fresca

Mineral	*Contenido*	*unidades*
Sodio	250-640	mg/L
Potasio	110-1500	mg/L
Cloro	800-1200	mg/L
Calcio	1100-1300	mg/L
Magnesio	70-140	mg/L
Fosforo	800-1000	mg/L
Hierro	100-700	ug/L
Zinc	2500-7000	ug/L
Cobre	100-350	ug/L
Manganeso	10-50	ug/L
Yodo	50-600	ug/L
Fluor	20-80	ug/L
Selenio	20-40	ug/L
Cobalto	0.5-1.3	ug/L
Cromo	0.5-20	ug/L
Molibdeno	20-100	ug/L
Niquel	0-50	ug/L
Arsenico	20-60	ug/L
Aluminio	50-1600	ug/L

Adaptado: (Karoui et al., 2006)

1.1.7 Tecnologías de procesamiento

1.1.8 Tecnología de Altas Presiones Hidrostáticas (HHP)

La principal aplicación de la tecnología de altas presiones hidrostáticas (HHP) es la conservación de los alimentos frente a los microorganismos y los procesos bioquímicos catalizados por enzimas Con el tratamiento de altas presiones hidrostáticas es posible destruir a la mayoría de los microorganismos sin los efectos de la temperatura, que provoca generalmente cambios indeseables y degradación de los componentes sensibles al calor (Okpala, Piggott, & Schaschke, 2010).

Las altas presiones modifican la estructura de los macro componentes alimentarios que contienen proteínas mediante la interrupción de interacciones no covalentes que provocan cambios mínimos en las características y calidad de los alimentos (Kelly, Huppertz, Fox, & Kelly, 2004). Al igual que la temperatura, también

puede causar efectos de desnaturalización, aunque los mecanismos son algo diferentes (Valente-Mesquita, Botelho, & Ferreira, 1998).

Bajo presión, las biomoléculas obedecen al principio de "Le-Chatelier", es decir, cada vez que se aplica estrés a un sistema en equilibrio, el sistema reaccionará para contrarrestar el estrés aplicado; por lo tanto, las reacciones que dan como resultado un volumen reducido se activarán bajo HHP. La alta presión (100-1000 MPa) afecta los cambios fisicoquímicos que conllevan un cambio en el volumen tales como los cambios conformacionales de las macromoléculas, los cambios en la estructura de la membrana o los cambios en la forma cristalina y el punto de fusión (Chawla & Patil, 2011).

1.1.8.1 Inactivación microbiana

Los fenómenos asociados a cambio de volumen están involucrados también en la inactivación de la mayoría de las células microbianas vegetativas: bacterias Gram negativas, levaduras, virus complejos, mohos y bacterias Gram positivas, las cuales exhiben distintos niveles de baro resistencia, incluso dentro de una sola especie o género. Otros parámetros que influyen en esta resistencia son el nivel de presión, tiempo de retención, temperatura de procesamiento, composición del medio o de los alimentos, aunque el pH tiene aparentemente poca influencia, altas concentraciones de sal o azúcar, y bajos contenidos de agua, ejercen efectos baro protectores muy fuertes (Regnault, Thiebaud, Dumay, & Cheftel, 2004).

La presión usada en los procesos de inactivación microbiana o enzimática es del orden de 100-600 MPa combinado con tiempos de tratamiento que van desde algunos segundos hasta varios minutos. Algunos tratamientos también se combinan con temperatura moderada entre 20 y 50 °C. Mediante un ejercicio de validación es posible establecer las condiciones de tratamiento tomando en consideración la matriz alimentaria y el microorganismo objetivo, sin embargo la tecnología por si sola aun no resulta eficaz en la destrucción de esporas, ya que estas presentan una extrema resistencia a las altas presiones (Paidhungat et al., 2002).

La etapa de desarrollo de los microorganismos también está relacionada con la sensibilidad al tratamiento, las células en fase logarítmica presentan una mayor sensibilidad al tratamiento por HHP que aquellas en fase estacionaria (Falloon & Henry, 2015). En cuanto al mecanismo de acción, la presión puede afectar e inhibir la síntesis de proteínas y producir una reducción del número de ribosomas en el microorganismo, puede causar la desnaturalización parcial de las proteínas celulares, también modificaciones celulares como la agregación de proteínas citoplasmáticas o condensación de los nucleótidos. En la fase logarítmica los microorganismos se

encuentran en división celular y por tanto la membrana es más sensible a los factores externos (Téllez, Ramírez, Pérez, Vázquez, & Simal, 2001; Yang et al., 2012).

Presiones iguales o superiores a 300 MPa producen daños irreversibles en el microorganismo, produciendo liberación de componentes intracelulares al medio extracelular, lo que conlleva la muerte del microorganismo. (Téllez et al., 2001). El empleo además de un tratamiento térmico moderado de temperaturas entre 45 y 50°C incrementan significativamente la inactivación microbiana. Por ejemplo en cepas patógenas de *Listeria monocitogenes* se logra reducir la carga inicial de microorganismos hasta niveles de inactivación microbiana superiores a 5 ciclos logarítmicos (Falloon & Henry, 2015; Kaur & Rao, 2017).

1.1.8.2 Modificación de macromoléculas

La alta presión hidrostática también afecta las reacciones bioquímicas, por la modificación estructural de las macromoléculas, la presión reduce el tamaño de las moléculas y promueve la formación de enlaces entre cadenas laterales. Las moléculas de proteína se desnaturalizan bajo alta presión, este es un fenómeno complejo que depende de la estructura de las proteínas, el valor de la presión, la temperatura y el pH (Chizoba Ekezie, Cheng, & Sun, 2018; López-Fandiño, 2006; Zobrist, Huppertz, Uniacke, Fox, & Kelly, 2005)

En su estado nativo, las proteínas se estabilizan mediante enlaces covalentes incluidos puentes disulfuro, además de las interacciones electrostáticas, asociadas a pares de iones, grupos polares, puentes de hidrógeno e interacciones hidrófobas. Los enlaces covalentes casi no se ven afectados por la HHP, al menos a temperaturas relativamente bajas (0–40°C), por lo que la estructura primaria de las proteínas permanece intacta durante el tratamiento con HHP

Los efectos de la presión están dados especialmente sobre la estructura cuaternaria a través de interacciones hidrófobas, sobre la estructura terciaria vía interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno, y en la estructura secundaria por modificaciones en los puentes de H e interacciones electrostáticas (Park & Clark, 2002; Patel, Singh, Anema, & Creamer, 2006; Subirade, Loupil, Allain, & Paquin, 1998).

En el rango de 100 a 300 MPa, estos cambios son reversibles, pero las presiones mayores a 300 MPa pueden provocar una desnaturalización irreversible de las proteínas. Las presiones muy altas (>700 MPa) pueden inducir una desnaturalización irreversible al afectar la estructura secundaria de las proteínas (Penna et al., 2007;

Subirade et al., 1998; Valente-Mesquita et al., 1998; Yang, Dunker, Powers, Clark, & Swanson, 2001).

La estabilización de los puentes de hidrógeno se mejora a bajas presiones y se rompe solo a presiones muy altas. Se observan cambios significativos en la estructura terciaria de las proteínas, que se mantienen principalmente por interacciones hidrófobas e iónicas, a presiones superiores a 200 MPa (Fonseca, Leite, & Conrrado, 2012).

Las proteínas multiméricas, unidas por enlaces no covalentes, se disocian a presiones relativamente bajas (~ 150 MPa), lo que altera las estructuras cuaternarias, a presiones superiores a 400 MPa, la mayoría de las proteínas se desnaturalizan, la sensibilidad a la presión o temperatura varía con el tipo de enlaces que mantienen la estructura; las estructuras con láminas β son más estables frente a la presión que aquellas con hélices α, el primero es casi incompresible, mientras que el segundo se puede deformar más fácilmente. Las proteínas oligoméricas se disocian en subunidades mientras que el volumen disminuye (Subirade et al., 1998).

El cambio inducido por la alta presión en las proteínas tiene profundos efectos en la funcionalidad nutricional y tecnológica y por supuesto su aplicación en la industria alimentaria (Padiernos, Lim, Swanson, Ross, & Clark, 2009). Las propiedades funcionales están relacionadas con las propiedades físicas, químicas y estructurales intrínsecas de las proteínas, incluyendo tamaño, forma, composición y secuencia de aminoácidos, carga neta, distribución de las cargas y relación hidrofobicidad / hidrofilicidad y particularmente están definidas por la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria, las uniones inter e intramoleculares, principalmente uniones disulfuro, la rigidez/flexibilidad molecular en respuesta a los cambios de las condiciones ambientales y la naturaleza y la extensión de las interacciones con otros componentes (Nakai & Modler, 1996). Además, los cambios en las proteínas dependen de parámetros adicionales como temperatura, pH, el solvente utilizado para el procesamiento, y el estado de preparación de las proteínas (Royer, 2002).

1.1.8.3 Efecto de HHP en las proteínas de la leche

La mayoría de las aplicaciones aprovechan el hecho de que HHP ejerce efectos antimicrobianos sin perjudicar la calidad nutricional, sin embargo, HHP puede inducir cambios en las principales proteínas de la leche (proteínas de suero y caseínas) que mejoran sus propiedades funcionales para determinados usos (Boonyaratanakornkit, Park, & Clark, 2002; Huppertz, Fox, & Kelly, 2004b; López-Fandiño, 2006; Padiernos et al., 2009; Patel, Singh, Havea, Considine, & Creamer, 2005).

En la leche, la HHP afecta las micelas de caseína y las proteínas del suero, las proteínas de suero α-lacto albúmina (α-La) y β-lacto globulina (β-Lg) se desnaturalizan en diferentes grados mediante el tratamiento con HHP, siendo el primero más resistente que el segundo (López-Fandiño, 2006). En la leche tratada a 300–600 MPa, se ha demostrado que β-Lg se asocia con las micelas de caseína (Carrascosa & Olano, 1996) y también forma agregados amorfos (Patel et al., 2005). El tratamiento de HHP a presiones de 200 MPa tiene poco efecto sobre el tamaño de las micelas de caseína, pero el tratamiento a más de 250 MPa causa una disrupción considerable de las micelas de caseína en la leche desnatada cruda. La disrupción de las micelas de caseína inducida por HHP causa cambios en las propiedades ópticas de la leche, como la ligereza y la turbidez (Regnault et al., 2004).

La aplicación de alta presión hidrostática a la leche puede inducir cambios en las propiedades de los geles de biopolímeros (Goyal, Sharma, Upadhyay, Sihag, & Kaushik, 2013) y en las propiedades emulsionantes de las proteínas del suero (Lim, Swanson, & Clark, 2008). Las micelas de caseína se desintegran bajo alta presión hidrostática, aparentemente debido a cambios en el balance mineral de la leche por disolución del fosfato cálcico coloidal (Huppertz et al., 2004b; Rasmussen et al., 1999; Regnault et al., 2004). El tratamiento HHP causa desnaturalización de las proteínas del suero (Patel et al., 2005).

Las proteínas séricas desnaturalizadas se depositan sobre la micela de caseína e interaccionan con estas mediante un complejo que implica a la κ-CN y a la β-Lg. En la leche, α–La y β–Lg interactúan entre sí y con las micelas de caseína, las interacciones covalentes mediante puentes disulfuro no ocurren sólo entre estas dos proteínas del suero sino también entre β–Lg y κ–caseína; la magnitud de la interacción depende de la presión y el tiempo de tratamiento (Hinrichs & Rademacher, 2004). Estas interacciones tienen consecuencias tecnológicas como el aumento en el rendimiento quesero y cambios en la textura de los productos de la coagulación.

La desfragmentación se produce por la solubilización de fosfato de calcio coloidal (CCP); que es responsable de la reticulación de las caseínas y de la neutralización de los grupos de fosfoserina cargados negativamente, por lo que se altera la estabilidad de las micelas. A alta presión, se produce la disrupción o desfragmentación de las micelas de caseína, en la que las micelas se dividen en componentes más solubles como las caseínas αs1, αs2, ß y k. (Goyal et al., 2013; Horne, 2009; Huppertz et al., 2004b).

Algunos autores han reportado un aumento de tamaño a 250 MPa que puede deberse a la interacción de β-Lg desnaturalizado con la micela de k-caseína (Huppertz et al., 2004b). A presiones superiores a 300 MPa, la reducción de tamaño en un 50% se

debe a la fragmentación de las micelas de caseína (Anema, Lowe, & Stockmann, 2005). Cuando la leche bovina desnatada cruda se trata con HHP a 100–600 MPa se observa un aumento en los niveles de αs1 y β-caseínas en la fase soluble de la leche (Considine et al., 2007; Regnault et al., 2004). Después del tratamiento a 400 o 600 MPa, los niveles de estas caseínas en la fase soluble de la leche son considerablemente más altos que los de la leche no tratada o la leche tratada a 100 MPa. Hay reportes que indican que esta condición se revierte al menos parcialmente durante el almacenamiento a 20 ° C durante 24 o 48 h. Los niveles de β-caseína soluble disminuyen probablemente debido al re arreglo de las partículas de las micelas a partir de fragmentos de micelas de caseína alteradas por HHP (Anema et al., 2005).

Las caseínas de las micelas pueden volver a asociarse bajo presurización prolongada a 200–300 MPa, debido a que los enlaces hidrofóbicos se favorecen sobre la solvatación hidrofóbica. La re-asociación no tiene lugar a mayor presión (Goyal et al., 2013).

El tamaño de la caseína en forma de micela se ve afectado solo levemente por el tratamiento de HHP a presiones inferiores a 200 MPa a 20°C debido a que tienen estructuras secundarias y terciarias muy pequeñas y dado que la HHP no afecta a los enlaces covalentes, no afecta a las micelas de caseína por debajo de 300 MPa (Considine et al., 2007; Goyal et al., 2013; Huppertz et al., 2004c; López-Fandiño, 2006; Patel et al., 2006; Regnault et al., 2004).

Por otra parte, la hidratación de las micelas se incrementa debido principalmente a la interacción de β-Lg desnaturalizada, con k-caseína, con una carga neta negativa lo que aumenta la hidratación o solubilidad, además de la ruptura de las micelas de caseína en las caseínas α_{s2}, α_{s1}, ß y k, que son más solubles en agua en comparación con la micela de caseína completa. El orden de disociación depende del contenido de fosfato de las variantes de caseína, a más residuos de fosfato, mayor es la estabilidad o menor es la disociación. Los números de residuos de fosfato en los componentes de la caseína son k= 1, ß = 5, α_{s1} = 8, α_{s2} = 11; por lo tanto el orden de disociación de variantes de caseína en leche bovina bajo HHP es k> ß> α_{s1}> α_{s2} (Anema et al., 2005; Regnault et al., 2004).

1.1.8.4 Efecto sobre la β-Lacto globulina (Lg) y α-Lacto albumina (La)

Bajo HHP, β-Lg se despliega y forma dímeros, polímeros y agregados con k-caseína, dependiendo del grado de presión y temperatura. La solubilización del fosfato de calcio coloidal se produce además de la fragmentación de las micelas de caseína y los cambios de los enlaces hidrófobos, iónicos y puentes de H da como resultado la

conversión de estructuras; que podría ser reversible o irreversible dependiendo de la intensidad de la presión (Hinrichs & Rademacher, 2004).

El comportamiento de las proteínas de suero bajo HHP es especialmente importante para la leche y los productos lácteos derivados, los primeros estudios sobre estas proteínas indicaban una disminución del contenido de nitrógeno en el suero, sugiriendo la desnaturalización e insolubilización de las proteínas del suero (Hinrichs & Rademacher, 2004).

La sensibilidad de las proteínas del suero está directamente relacionada con su estructura, la ß-Lg es más sensible a HHP ya que solo tiene dos enlaces disulfuro y uno grupo –SH libre, por esta razón es menos rígida en comparación con α-La que tiene cuatro enlaces disulfuro. El tratamiento de leche cruda hasta 100 MPa no desnaturaliza la ß-Lg y permanece en forma de monómero nativo. (Chawla & Patil, 2011). Sin embargo, a presión superior a 100 MPa, se produce el despliegue de la ß-Lg y el grupo SH queda expuesto y por lo tanto puede interactuar con k-caseína u otras moléculas. Esto se traduce en un aumento en el tamaño de las micelas de caseína y la agregación con las moléculas de ß-Lg. (Huppertz et al., 2004c; Regnault et al., 2004).

La aplicación presiones mayores da como resultado una considerable desnaturalización de la ß-Lg, alcanzando el 70–80% después del tratamiento en 400 MPa (Centre, North, Zealand, North, & Zealand, 2005; Considine et al., 2007; Goyal et al., 2013; Hinrichs & Rademacher, 2004). Durante el almacenamiento, puede ocurrir la re naturalización en un periodo entre 1 y 2 días (Centre et al., 2005).

La concentración de α-La en la leche de vaca varía de 1.2 a 1.5 g / L, y es el segundo componente más grande (20%) en la proteína de suero (Nakai & Modler, 1996) α-Lacto albumina tiene cuatro enlaces disulfuro intramoleculares sin grupos tiol libres y muestra estructura de glóbulo fundido (MG), que es altamente estable, α-La es más resistente a la desnaturalización bajo presión (Yang et al., 2001).

La desnaturalización de α-La comienza solo a presiones superiores a 400 MPa (Anema, 2012) y el grado de desnaturalización inducida por HHP de α-La y β-Lg aumenta con el tiempo de retención, la temperatura y el pH de la leche (Goyal et al., 2013).

En la tabla 1.2-4 se puede ver la susceptibilidad relativa de las proteínas frente al tratamiento térmico y al tratamiento por alta presión, la β-Lg es especialmente susceptible a la presión y menos al calor, lo que algunos estudios han interpretado como la diferencia en el mecanismo de desnaturalización que exhiben los dos tratamientos (Indyka, Williams, & Patel, 2008; Wijayanti, Bansal, & Deeth, 2014).

Tabla 1.2-4 Susceptibilidad de las proteínas de leche

Proteínas.	*Susceptibilidad inducida por HPP*	*Susceptibilidad inducida por calor*
ß-lacto globulina	+++++	++
Inmunoglobulinas	+++	+++++
α-lacto albumina	++	+
BSA	++	+++

Adaptado: (Goyal et al., 2013)

1.1.8.5 Efecto sobre la albúmina de suero bovino, inmunoglobulinas, lactoferrina y lisozima

La albúmina de suero bovino (BSA) es un polipéptido único de 582 aminoácidos, con 17 puentes disulfuro y un grupo tiol libre, Cys 34, la estructura de la proteína BSA está compuesta por un 76% de hélices, un 10% de vueltas y un 23% de cadena extendida y ninguna beta (ß) (Nakai & Modler, 1996).

La BSA es muy resistente a la presión hasta 400 MPa, probablemente debido a la gran cantidad de enlaces disulfuro y se produce una desnaturalización muy pequeña por encima de los 400 MPa (Balthazar et al., 2018; Considine et al., 2007).

Las inmunoglobulinas son más resistentes a presiones de hasta 300 MPa. Las inmunoglobulinas, lactoferrina y lisozima son resistentes a HHP (Anema, 2012; Yang et al., 2001).

1.1.9 Ultrasonido de potencia (UP)

El ultrasonido se define como ondas mecánicas cuya frecuencia es mayor del umbral del oído humano (> 16kHz), estas se propagan a través de una serie de ondas de compresión y rarefacción inducidas sobre las moléculas del medio que atraviesa (Knorr, Zenker, Heinz, & Lee, 2004).

Dependiendo de la frecuencia utilizada y la amplitud de la onda de sonido aplicada se producen varios efectos físicos, químicos y bioquímicos como consecuencia de la generación de calor por la cavitación (implosión de burbujas de gas) causada por un cambio rápido de temperatura que puede llegar a 5500 °C y un aumento de la presión a 50 MPa durante un tiempo muy corto en el punto donde se produce la cavitación con un orden de variación de temperatura de 109 °C / s (Leighton, 1998).

La cantidad de energía liberada por la cavitación depende de la cinética del crecimiento y colapso de las burbujas, aumenta con la tensión superficial en la interface de la burbuja, y disminuye con la presión de vapor del líquido. En general los alimentos tienen una tensión superficial relativamente alta, por lo que pueden ser un medio eficaz para la cavitación (Knorr et al., 2004).

El criterio más importante para la clasificación de las aplicaciones en los alimentos es la cantidad de energía del campo sonoro, que se caracteriza por la potencia sonora(W), intensidad del sonido (W / m2) o densidad de energía del sonido (Ws / m3) (Leighton, 1998).

Los tratamientos de ultrasonido se clasifican en dos tipos, en primer lugar, alta frecuencia y baja potencia que es ultrasonido de baja energía con frecuencia superior a 100 kHz y potencia inferior a 1 W/ cm^2 (Leighton, 1998), se utilizan para detección no invasiva (control de proceso) y para caracterizar las propiedades fisicoquímicas de materiales alimenticios evaluación o control del producto, actividad de células vivas, limpieza de superficies de alimentos, efectos sobre las enzimas, extracción asistida por ultrasonidos, cristalización, emulsificación, filtración, secado, procesos de congelación y des congelación, así como de ablandamiento de carne (Awada, Moharramb, Shaltoutc, Askerd, & Youssefd, 2012).

En segundo lugar, el ultrasonido de alta potencia, superior a 1 W/ cm^2 y baja frecuencia (20–100 kHz) se usa ampliamente debido a los poderosos efectos de cavitación (Chandrapala & Leong, 2014), además en estos sistemas se generan fuerzas físicas como la radiación acústica, el corte, la transmisión acústica, la micro-inyección y las ondas de choque, que influyen en las propiedades físicas, mecánicas y químicas de un sistema alimentario (Leighton, 1998; McClements, 1995).

1.1.9.1 Efecto del ultrasonido sobre los microorganismos

La tecnología de ultrasonido se basa en fenómenos físicos que son fundamentalmente diferentes a la pasteurización convencional. Se produce a través del mecanismo de cavitación acústica, generado por la aplicación de bajas frecuencias, con la formación instantánea de micro burbujas, seguido de un colapso inmediato, lo que resulta en una gran tasa de micro cizallamiento en el producto (Iorio et al., 2018; Monteiro et al., 2018).

El estrés intenso junto con el micro cizallamiento es responsable de la inactivación microbiana y enzimática, además, las altas temperaturas y presiones

creadas dentro de la burbuja son responsables de la generación de átomos de hidrógeno y radicales hidroxilo (Balthazar et al., 2018).

Los efectos letales de la cavitación se orientan principalmente a su acción sobre la membrana celular con distintos modos de acción, generalmente denominados sonoporación. Estos efectos son: a) cavitación simple, aumento e implosión del tamaño de burbuja cerca de la membrana; b) empuje por expansión de la burbuja que puede tocar y empujar la membrana; c) tirar, las burbujas pueden tirar de la membrana durante la fase de compresión / contracción, lo que conduce a la ruptura; d) chorro de agua por la asimetría en el colapso de las burbujas puede crear un embudo; e) la corriente de fluido alrededor de la oscilación burbuja crea efectos de cizallamiento; f) las fuerzas de radiación ultrasónica de alta intensidad pueden difundir a través de la membrana (D'amico, Silk, Wu, & Guo, 2006; Iorio et al., 2018). Los efectos letales dependen también de algunas variables como por ejemplo el tamaño de la célula, el tipo de bacteria. Las bacterias Gram negativas son más sensibles; la composición de la matriz alimentaria, ya que algunos componentes podrían tener un efecto protector y el numero inicial de microorganismos (Piyasena, Mohareb, & McKellar, 2003).

El efecto del ultrasonido sobre levaduras y bacterias incluye cambios morfológicos, adelgazamiento y / o alteración de la membrana celular y posibles lesiones en el ADN (Iorio et al., 2018; Monteiro et al., 2018).

El daño letal del ultrasonido puede alcanzar una reducción de hasta 5 unidades logarítmicas, sin embargo, bacterias como el *Staphylococcus spp*. no se ve afectada por el tratamiento, atribuida esta resistencia a las propiedades de la cápsula bacteriana. Los microbios con una cápsula más espesa y "blanda" son altamente resistentes al proceso de inactivación por ultrasonido (Gao, Lewis, Ashokkumar, & Hemar, 2014).

El ultrasonido se puede utilizar en procesos de fermentación, tanto para influir en su progreso, como para monitorear los cambios en la composición química durante la fermentación que proporciona información en tiempo real sobre el progreso de la reacción. El ultrasonido de baja frecuencia (20–50 kHz) puede influir en el curso de la fermentación al mejorar la transferencia de masa y la permeabilidad celular, lo que conduce a una mejor eficiencia y tasas de producción. También se puede utilizar para eliminar microorganismos que de otro modo podrían dificultar el proceso (Mason, O'Donnell, Kerry, Ojha, & Tiwari, 2017).

1.1.9.2 Efecto del ultrasonido sobre las proteínas lácteas

Las principales aplicaciones del ultrasonido en la industria láctea tienen que ver con procesos como la homogenización, emulsificación, cristalización y por supuesto la

inactivación microbiana como un proceso de pasteurización (Balthazar et al., 2018; Chandrapala, Martin, Kentish, & Ashokkumar, 2014; Farrag & Shendy, 2010; Huang et al., 2018; Monteiro et al., 2018; Potoroko et al., 2018; Zisu, Bhaskaracharya, Kentish, & Ashokkumar, 2010).

Además de estas aplicaciones se sabe que el ultrasonido puede mejorar la eficiencia en procesos como la coagulación en la producción de quesos, debido a su capacidad para cambiar la funcionalidad de las proteínas de la leche. Por ejemplo; cambios en el comportamiento de gelificación o modificaciones de la textura, en general todos aquellos cambios asociados principalmente con interacciones proteína-proteína y / o proteína-grasa (Chandrapala & Leong, 2014; Chandrapala, Zisu, Kentish, & Ashokkumar, 2012).

El ultrasonido de potencia promueve predominantemente efectos físicos resultantes de los efectos inducidos por cizallamiento debidos a los micro jets cerca de la superficie sólida, el pulso de presión emitido hacia el entorno (propagación de ondas de choque) y la turbulencia que se crean durante el colapso asimétrico de burbujas de cavitación formadas, dan como resultado ciclos de rarefacción de la presión acústica (Silva, Zisu, & Chandrapala, 2018).

La actividad sonoquímica actúa sobre las propiedades de cuajado de la leche tales como el tiempo de gelificación, la firmeza del gel, la tasa de firmeza de cuajada y la conectividad de la red del gel; estas propiedades están influenciadas por una serie de factores de composición y fisicoquímicos en la leche, incluido el pH, la concentración total de sólidos, el contenido de proteínas, el contenido de calcio libre y en la micela y el estado del fosfato de calcio, que controlan el estado de asociación de las proteínas de caseína en micelas (Liu, Juliano, Williams, Niere, & Augustin, 2014).

El procesamiento de ultrasonido de baja frecuencia puede cambiar el tamaño de partícula de las micelas de caseína en la leche descremada, con efectos importantes en la reducción del tamaño de los glóbulos grasos (Chandrapala, Martin, Zisu, Kentish, & Ashokkumar, 2012; Kentish & Ashokkumar, 2011; Zhao et al., 2014),

El ultrasonido también causa la desnaturalización de las proteínas del suero, reduce el tamaño de las partículas de caseína, mejora la elasticidad y densidad de geles inducidos por ácido, produciendo geles de yogurt más interconectados u homogéneos, atribuido a una disminución en el tamaño de las micelas de caseína por los efectos físicos de la cavitación (Liu et al., 2014; Rahaman, Vasiljevic, & Ramchandran, 2016).

Las propiedades funcionales y estructurales de las soluciones acuosas de albúmina de suero bovino (BSA) se alteran por la aplicación de ultrasonido, se presentan cambios en la actividad superficial y cambios mínimos en la estructura global de BSA,

la carga superficial aumenta, con aumento del tamaño de partícula y disminución del número de grupos sulfhídrilo libres que puede atribuirse a la formación de agregados de proteínas. La hidrofobicidad superficial aumenta y el análisis FTMIR indica cambios en la estructura secundaria (Gülseren, Güzey, Bruce, & Weiss, 2007).

1.1.10 Métodos analíticos

1.1.11 Análisis de textura

La textura resulta de la combinación de elementos macro y micro estructurales, relacionada con las interacciones de los componentes de los alimentos. El análisis de perfil de textura (TPA) es un procedimiento instrumental para medir y cuantificar los parámetros relacionados con la textura. La magnitud de estos parámetros está influenciada por las variables de las mediciones, por lo tanto, debe realizarse bajo condiciones estandarizadas (Gutierrez-Mendez, Trancoso, & Leal, 2013; Rosenthal, 1992).

El análisis de perfil de textura se define como una prueba imitativa en la cual se pretende reproducir el masticado del producto. Los principales parámetros texturales obtenidos con el análisis de perfil de textura son: fractura, dureza, cohesión, adhesividad, elasticidad gomosidad y masticabilidad (Rosenthal, 1992). Los quesos son productos poco quebradizos para los cuales el TPA ha sido ampliamente usado donde la dureza y la elasticidad son parámetros determinantes de la evaluación de la textura (Gutierrez-Mendez et al., 2013).

Tal como se ve en la Figura 1-3, la fracturabilidad, es el pico inicial de fuerza durante la primera compresión. Se refiere a la dureza con la cual el alimento se desmorona, cruje o revienta y se expresa en unidades de fuerza.

La fuerza máxima obtenida durante la primera parte de compresión, imitando el primer mordisco, corresponde a la dureza y es la fuerza requerida para comprimir un alimento entre los molares o entre la lengua y el paladar, se expresa en unidades de fuerza.

El área de fuerza negativa representa la adhesividad, en el primer mordisco y representa el trabajo requerido para superar las fuerzas atractivas entre la superficie del alimento y la superficie de otros materiales con los que el alimento entra en contacto.

La elasticidad se relaciona con la altura a la que el alimento se recupera durante el lapso de tiempo entre el final del primer mordisco y el inicio del segundo y mide cuánta estructura original del alimento se ha roto por la compresión inicial, es la relación entre las distancias 2 y 1 señaladas en la Figura 1-3.

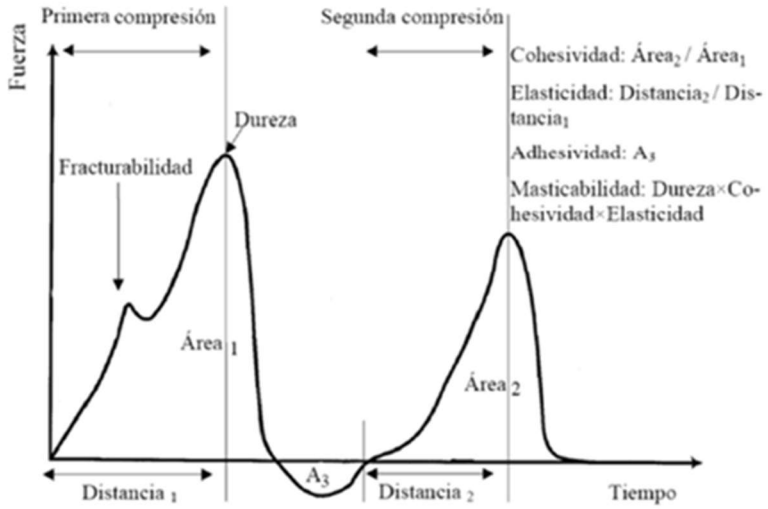


Figura 1-1. Curva típica del análisis de textura (Rosenthal, 1992)

Las demás características texturales son medidas derivadas de esta información básica registrada automáticamente por el equipo, con los datos obtenidos se calculan los parámetros de textura a partir de las curvas de fuerza (N) x tiempo (s) generadas durante el ensayo, tal como se muestra en la tabla 1.4-1.

Tabla 1.1.11-1 Parámetros de textura calculados a partir del grafico

Parametro Textural	***Relación matemática***	***Análisis dimensional y Unidades SI1***
Fracturabilidad *(Fracturability)*	F_1	$[MLT^{-2}] = (N)$
Dureza *(Hardness)*	P_1	$[MLT^{-2}] = (N)$
Cohesividad *(Cohesiveness)*	$\frac{A_{2c}}{A_{1c}}$	$\frac{[ML^2T^{-2}]}{[ML^2T^{-2}]}$=(su)
Adhesividad *(Adhesiveness)*	A_3	$[ML^2T^{-2}]$=(J)
Elasticidad *(Springiness)*	d_2	[L]=(m)
Gomosidad *(Gumminess)*	Gomosidad=Cohesividad*Dureza $\frac{A_{2c}}{A_{1c}} * P_1$	$[MLT^{-2}] = (N)$
Maticabilidad *(Chewiness)*	Masticabilidad= Gomosidad* Elasticidad $\frac{A_{2c}}{A_{1c}} * P_1 * d_2$	$[ML^2T^{-2}]$=(J)
Fibrosidad *(Stinginess)*	d_3	[L]=(m)
Resiliencia *(Resilience)*	$\frac{A_{1d}}{A_{1c}}$	$\frac{[ML^2T^{-2}]}{[ML^2T^{-2}]}$=(su)

1 L= longitud (m); M= masa (kg); T=tiempo(s)

1.1.12 Determinación del tamaño de partícula (DLS)

Para el análisis del tamaño de partícula, la muestra es iluminada con un láser y la intensidad de la luz dispersada producida por las partículas fluctúa a una velocidad que es dependiente del tamaño de las partículas, el análisis de la intensidad de estas fluctuaciones permite estimar el coeficiente de difusión translacional (D) de la partícula y a partir de éste el tamaño de la misma mediante la ecuación de Stokes–Einstein.

Ecuación 1.4-2-1 $$d(H) = \frac{-kT}{3\pi\eta \mathrm{D}}$$

donde, d(H): diámetro hidrodinámico (m); D: coeficiente de difusión translacional (m^2. s^{-1}); k: constante de Boltzmann (1,38 x 10-23 N.m.K-1); T: temperatura absoluta (K); η: viscosidad ($N.s.m^{-2}$).

El tamaño se obtiene a partir de la función de correlación usando varios algoritmos. Se considera el análisis de Cúmulos, donde, se ajusta una exponencial simple a la función de correlación para obtener el tamaño promedio (diámetro hidrodinámico promedio o “z – average”) y una estimación del ancho de la distribución (índice de poli dispersión). El índice de poli dispersión refleja el grado de asociación de las partículas (Anema et al., 2005).

1.1.13 Hidrofobicidad superficial (H_0)

Los parámetros hidrófobos, estéricos y eléctricos son las variables más importantes que afectan la estructura de las proteínas. Entre estos factores, se sabe que la hidrofobicidad está relacionada significativamente con las propiedades funcionales de las proteínas, la tendencia de los solutos no polares a adherirse entre sí en un ambiente acuoso se llama hidrofobia y una forma para cuantificar la hidrofobicidad de proteínas es a través de métodos de sonda fluorescente (Nakai & Modler, 1996).

Los métodos fluorescentes dependen de la respuesta de algún componente fluorescente, ya sea intrínseco o extrínseco, a su entorno después de la excitación óptica (Karoui, 2017). Los rendimientos cuánticos de fluorescencia y la longitud de onda de emisión de fluorescencia máxima de estos compuestos dependen de la polaridad de su entorno (Alizadeh-Pasdar, Li-Chan, & Eunice, 2000).

Varias sondas fluorescentes como el ácido 1-anilinonaftaleno-8-sulfónico (ANS) se ha utilizado ampliamente para medir la hidrofobicidad de las proteínas. Esta sonda tiene bajo rendimiento cuántico de fluorescencia en solución acuosa, pero tras la unión

de la sonda a regiones hidrófobas accesibles de proteínas, se observa un aumento en la fluorescencia, que se usa como una medida de la hidrofobicidad de la superficie de la proteína. La intensidad relativa de fluorescencia neta para cada concentración de proteína se registra como la diferencia entre las intensidades medidas para cada solución con sonda y un blanco sin sonda. La hidrofobicidad superficial (H_0) de la proteína es el valor de la pendiente del gráfico de intensidad relativa de fluorescencia neta en función de la concentración de la proteína (% p/v) y se calcula por análisis de regresión lineal (Alizadeh-Pasdar et al., 2000).

Las sondas 1–anilinonaftaleno–8–sulfonato(ANS) y 6-propionil-2- (dimetilamino) - naftaleno (PRODAN) son conocidos por detectar la polaridad en materiales biológicos. Las emisiones de fluorescencia de ANS y algunos análogos cercanos dependen del medio ambiente. ANS está compuesto de anillos aromáticos, mientras que PRODAN, por otro lado, es una sonda sensible al solvente y no tiene carga, lo que eliminará posibles contribuciones a la interacción electrostática en la medición (Alizadeh-Pasdar et al., 2000).

1.1.14 Análisis Infrarrojo con transformada de Fourier (FTMIR)

El espectro de vibración de infrarrojo de una molécula es considerado como su huella digital, por ser una propiedad física única y característica de cada molécula. Por esto, el espectro de infrarrojo puede ser usado para la identificación de muestras mediante la comparación de espectros de referencia conocidos. Este principio está basado en el hecho de que, debido a las características estructurales de la molécula, el enlace entre moléculas o grupos funcionales unidos a la molécula, producen absorción característica y reproducible en la región infrarroja del espectro electromagnético (Grdadolnik, 2002).

El espectro de infrarrojo se genera como una consecuencia de la absorción de la radiación electromagnética a frecuencias que se relacionan con la vibración de un conjunto especifico de enlaces químicos dentro de la molécula. En la espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTMIR) solo es usado un haz y todas las frecuencias requeridas, pasan a través de la muestra a analizar en el mismo instante de tiempo. La transformada de Fourier es utilizada como herramienta matemática para interpretar los datos y producir un espectro de manera casi inmediata (Kong & Yu, 2007a).

En la caracterización de proteínas, la variedad de grupos químicos presentes en banda amino, los residuos ácidos, el enlace peptídico en sí, y la posible presencia de

grupos prostéticos, dan lugar a numerosas bandas vibratorias que pueden ser sensibles a los cambios estructurales inducidos en la molécula de proteína tras el tratamiento a presión (Fonseca et al., 2012).

En la tabla 1.4-2 se describen las siete bandas características del enlace peptídico, así como la frecuencia aproximada de aparición en el espectro infrarrojo de las muestras de proteínas.

Tabla 1.4-2 Bandas características del enlace peptídico

Denominación	***frecuencia aproximada Cm^{-1}***	***Descripción***
Amida A	3300	Estiramiento NH
Amida B	3100	Estiramiento NH
Amida I	1699-1690	Estiramiento C=O
Amida II	1480-1575	Estiramiento CN, flexion NH
Amida III	1229-1301	Estiramiento CN, flexion NH
Amida IV	625-767	Flexión OCN
Amida V	640-800	Flexión NH fuera del plano
Amida VI	537-606	Flexión C=O fuera del plano
Amida VII	200	Torción esqueleto

Adaptado: (Kong & Yu, 2007a)

De las siete bandas infrarrojas descritas provenientes del enlace peptídico, solo la banda amida I ha demostrado tener una información importante para una caracterización detallada de la estructura secundaria de la proteína. En términos de energía de vibración, los orígenes de la banda amida I predominantemente del estiramiento CNO de amida, que se combina con el estiramiento CN y la formación de CCN. Como la energía de esta vibración compleja depende en gran medida de la presencia y la geometría de los enlaces de hidrógeno, la frecuencia de la banda amida I se ve afectada por la estructura secundaria, en la que se incorpora el enlace amida particular (Fonseca et al., 2012).

En la tabla 1.4-3 se describen las bandas que directamente son usadas en la descripción de formas estructurales de las proteínas, tales como estructuras secundaria y terciaria.

Tabla 1.4-3 Bandas de vibración con valor diagnóstico para estudios FTMIR de proteínas

Vibración	*Diagnostico*	*Longitud de honda*
Banda Amida I	Estructura secundaria	1610-1690
Bandas Amida II/II	Progreso del intercambio H / D	1515-1560
Anillo de Tirosina	Estructura terciaria	1515
Estiramiento antisimetrico de grupos COO-	Tipo de quelación de Ca2+ en proteínas unidas a calcio	1560-1590

Adaptado: (Kong & Yu, 2007a)

La banda Amida I muestra una alta sensibilidad a pequeñas variaciones en la geometría molecular y los patrones de enlace de hidrógeno lo que le da utilidad para el análisis de la composición de la estructura secundaria de proteínas y los cambios conformacionales. En la región amida I (1700−1600 cm^{-1}), cada tipo de estructura secundaria da lugar a una frecuencia de estiramiento C = O diferente debido a la geometría molecular única y al patrón de enlace de hidrógeno. Los anchos de banda de las vibraciones que surgen de diferentes componentes de la estructura secundaria son grandes en comparación con la separación entre las frecuencias correspondientes, lo que hace que la banda amida I se superponga fuertemente y sea necesaria una mejora de resolución. Por lo tanto, los métodos matemáticos, como la técnica de mejora de la resolución, son necesarios para resolver el componente de banda individual correspondiente a la estructura secundaria específica, permitiendo que los componentes intrínsecamente amplios se estrechen y separen más allá de la resolución del instrumento (Grdadolnik, 2002).

El proceso matemático de estrechamiento de bandas no aumenta la resolución instrumental, sino que incrementa el grado de separación al reducir el ancho de banda medio de los componentes individuales para facilitar la visualización. Este proceso de estrechamiento de la banda se logra a expensas de la calidad espectral de la banda original, lo que conduce a una degradación de la relación señal / ruido. Se han desarrollado varios métodos para estimar cuantitativamente las contribuciones relativas de diferentes tipos de estructuras secundarias en proteínas a partir de sus espectros IR de amida I en solución, incluido el ajuste de la curva FSD y el análisis de segunda derivada (Kong & Yu, 2007a).

La Tabla 1.4-4 muestra las asignaciones típicas de los componentes de la estructura secundaria a los números de onda obtenidos después de la mejora de la

resolución de los espectros de absorción originales (Glassford, Byrne, & Kazarian, 2013).

Las segundas derivadas de los espectros permiten la identificación de varias estructuras secundarias presentes en la proteína. En la tabla se ilustra la asignación de estructuras en la banda Amida I. Un método mejorado para llevar a cabo el análisis y determinación cuantitativa y cualitativa de la α hélice, la lámina β plegada, las estructuras aleatorias y de giro (Glassford et al., 2013).

Tabla 1.4-4 Asignación de estructuras secundarias en banda Amida I (usando desconvolución)

Frecuencia media cm^{-1}	*Asignación*
1624 ±1.0	β-Plegada
1627 ±2.0	β-Plegada
1633 ±2.0	β-Plegada
1638 ±2.0	β-Plegada
1642 ±1.0	β-Plegada
1648 ±2.0	Aleatoria
1656 ±2.0	α-Helice
1663 ±3.0	3_{10} Helice
1667 ±1.0	β-giro
1675 ±1.0	β-giro
1680 ±2.0	β-giro
1685 ±2.0	β-giro
1691 ±2.0	β-Plegada
1696 ±2.0	β-Plegada

Adaptado: (Glassford et al., 2013)

1.1.15 Medición de isotermas de adsorción

Para la obtención de las curvas de adsorción, se puede utilizar un método gravimétrico que consiste en alcanzar el estado de equilibrio de una masa conocida de muestra con una atmósfera de humedad relativa estándar, dada por soluciones salinas de aw conocidas (en un rango de 0.1 - 0.9), a tres temperaturas diferentes para poder determinar el calor isostérico de sorción. A partir de los resultados obtenidos se aplican los modelos matemáticos que describen el comportamiento de las curvas y la calidad

del ajuste de los modelos propuestos se evalúa por medio del coeficiente de correlación (R^2).

1.1.15.1 Modelado de las isotermas de adsorción

Para explicar el comportamiento en el proceso de adsorción se determinan los parámetros de modelos matemáticos que describen estos comportamientos, estas ecuaciones se obtienen mediante el ajuste de datos experimentales. Como ejemplos se pueden citar los modelos de Brunauer-Emmett-Teller (1938), Oswin (1946), Smith (1947), Halsey (1948), Henderson (1952), Guggenheim Anderson y De Boer (1981) y Peleg (1993). Algunos de estos modelos proporcionan parámetros con significado físico debido a su fundamento termodinámico.

Todas estas ecuaciones empíricas y semiempíricas se han propuesto para correlacionar el contenido de humedad de equilibrio con la actividad de agua de un alimento, sin embargo, la ecuación de GAB (Guggenheim-Anderson-de Bóer) es de amplio uso en alimentos, está basada en la teoría de adsorción de BET (Brunauer-Emmet-Teller), la cual da una explicación física a los parámetros involucrados además es una ecuación simple a partir de la cual se obtiene mucha información termodinámica útil (Gil, Muratona, Yacanto, Soteras, & Abaca, 2013a).

Mediante las determinaciones experimentales se establece la relación entre el contenido de humedad de la muestra liofilizada con su actividad de agua (aw) en los fenómenos de adsorción, correlacionando su comportamiento con el modelo de GAB, para comparar su comportamiento e interpretar los resultados. El ajuste de las ecuaciones a los datos experimentales de las isotermas de adsorción se realiza mediante la herramienta de optimización no lineal Solver de Microsoft Excel 2007 (Microsoft, Redmond, WA, USA).

Ecuación 1.1.1-1 $$X = \frac{Xm.C.k.aw}{(1-k.aw).(1+(C-1)k.aw)}$$

Donde: X: contenido de humedad, Kg agua/ Kg masa seca; Xm: Contenido de humedad de mono capa; C: constante de Guggenheim, característica del producto y relacionada con el calor de adsorción de la monocapa; K: factor de corrección relacionado con el calor de sorción de la multicapa; aw: actividad de agua

Para el cálculo del calor isostérico se utiliza la ecuación de Clausius Clayperon. graficando –ln (aw) frente a 1/T para valores fijos de humedad. Se realiza el ajuste lineal

de las rectas y de la pendiente se obtiene el calor isostérico neto de sorción (qst) para cada valor de la humedad.

Ecuación 1.1.1-2

$$qst = -R\frac{dlnaw}{d(\frac{1}{T})}$$

Ecuación 1.1.1-3

$$qst = Qs - \Delta Hv$$

Dónde: qst: calor isostérico neto de sorción a contenido de humedad constante Qst: Calor de sorción total ∆Hv: Calor latente de vaporización R: constante universal de los gases T: temperatura absoluta.

1.1.16 Microscopia electrónica de barrido SEM

La microscopia electrónica de barrido SEM se basa en el principio de la microscopia óptica en la que se sustituye el haz de luz por un haz de electrones, se consigue una resolución de hasta 100Å, resolución muy superior a cualquier instrumento óptico. Su funcionamiento consiste en hacer incidir un barrido de haz de electrones sobre la muestra. La muestra (salvo que ya sea conductora) está generalmente recubierta con una capa muy fina de oro o carbón, lo que le otorga propiedades conductoras. La técnica de preparación de las muestras se denomina pulverización catódica. Al alcanzar el haz la superficie de la muestra se generan principalmente las siguientes partículas: electrones retro dispersados (e1), electrones secundarios (e2), además de radiación electromagnética (rayos X) y otras partículas menos significativas.

El microscopio se encuentra internamente equipado con unos detectores que recogen la energía y la transforman en las siguientes imágenes y datos:

- Detector de electrones secundarios: (SEI – Secundary Electron Image) con los que se obtienen las imágenes de alta resolución.
- Detector de electrones retro dispersados: (BEI – Backscattered Electron Image) con menor resolución de imagen, pero mayor contraste para obtener la topografía de la superficie.
- Detector de energía dispersiva: (EDS – Energy Dispersive Spectrometer) detecta los rayos X generados y permite realizar un análisis espectro gráfico de la composición de la muestra.

1.1.16.1 Crio-SEM

Se trata de una metodología de SEM convencional, donde se adapta una cámara de baja temperatura lo que facilita el examen microscópico de productos lácteos ricos en agua, aire o grasa con una distorsión mínima, tales como el yogur, el helado y la mayoría de los quesos (Kalab, 1980). Esta técnica SEM utiliza temperaturas por debajo de -80°C durante todo el protocolo de examen de la muestra. Se ha utilizado Crio-SEM para los análisis micro estructurales del queso por sus ventajas de mínima preparación de muestras y resulta más adecuada para queso con grasa, especialmente donde el componente de grasa podría ser alterado por métodos de desgrasado o deshidratación, lo que podrían resultar en artefactos, si se utiliza el protocolo de la técnica SEM convencional. (El-Bakry & Sheehan, 2014).

1.1.17 Reológia

La reológia es la ciencia que estudia la relación entre la deformación y el flujo de la materia, incluye la investigación del comportamiento de los materiales con relación a la tensión aplicada o el estrés (Steffe, 1996a).

Tanto las propiedades reológicas como texturales están estrechamente vinculadas a la respuesta sensorial de los productos alimentarios. Aunque las propiedades reológicas están a nivel macroscópico, están directamente relacionadas con las propiedades a nivel micro estructural (Rao, 2007).

Se puede realizar la deformación de las muestras durante las mediciones reológicas, a través de cizallamiento, extensión o compresión a granel, dependiendo de los materiales probados y dado que la mayoría de los alimentos no exhiben un comportamiento newtoniano (la deformación no es directamente proporcional al esfuerzo), no basta con la medición de viscosidad.

El gradiente de velocidad en un fluido (γ) es resultado de un esfuerzo cortante tangencialmente aplicado (σ) y la viscosidad es la fricción interna del fluido.

Esta relación se describe en la ecuación:

Ecuación 1.1.1-1

$$\eta a = \frac{\sigma}{\gamma}$$

La viscosidad de los fluidos newtonianos, que es independiente de la velocidad de corte, es simbolizada como η. La viscosidad de los fluidos no newtonianos se denomina viscosidad aparente, significa que depende de la velocidad de corte y se

denota como η_a. Por lo tanto, el valor de una viscosidad aparente deberá estar referido a un determinado valor de cizallamiento (Steffe, 1996a).

En la Figura 1-4 se puede ver el comportamiento de distintos tipos de fluido en relación al esfuerzo de corte y la deformación. La relación entre el esfuerzo cortante y la velocidad de corte de los fluidos newtonianos es lineal y comienza en cero, en el caso de los fluidos pseudoplásticos o dilatantes las relaciones no son lineales entre el esfuerzo cortante y la velocidad de corte; en un fluido pseudoplástico el comportamiento posiblemente sea causado por la ruptura de las unidades estructurales durante el corte y por el contrario un fluido dilatante, el engrosamiento se debe al soluto intacto reorganizado por cizallamiento (Steffe, 1996a).

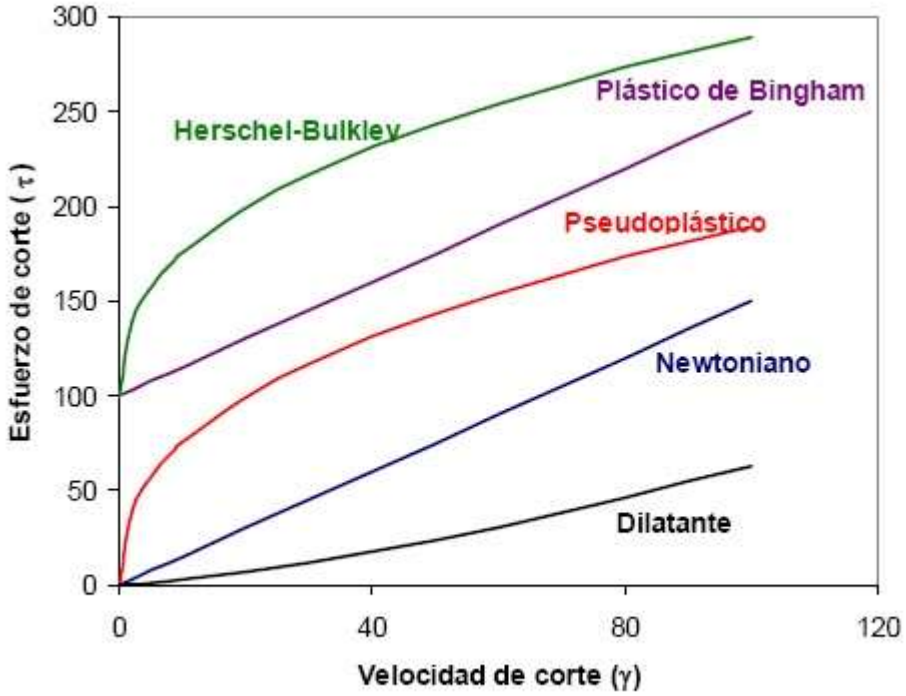


Figura 1-4 Comportamiento reológico.
https://cienciaeingenieriademateriales.wordpress.com/2012/10/24/plasticos-de-bingham/

En algunos casos, se requiere un esfuerzo inicial (τ_o) para comenzar un flujo y cuando el fluido sigue un comportamiento lineal, se ajusta al modelo de plástico Bringham; si el fluido muestra un adelgazamiento por cizallamiento, se denomina como tixotrópico, donde las partículas de soluto en el fluido necesitan tiempo para conectarse;

por lo tanto, la alta cizalla reduce el tamaño de las unidades estructurales resultando en la disminución de la resistencia al flujo (Rao, 2007).

En la Tabla 1.4-5 se muestran los principales modelos matemáticos que describen estos comportamientos, el cálculo de los parámetros o valores constantes de estos modelos, con base en los datos experimentales, permite la descripción del comportamiento de un fluido en particular.

Los materiales viscoelásticos son aquellos que poseen tanto comportamiento de sólido elástico como de líquido viscoso. Un material elástico ideal será finalmente deformado y se recuperará completamente una vez que se elimina el estrés; un fluido viscoso ideal se deformará siempre que se aplique la tensión y no se recuperará cuando se elimine la tensión porque el estrés se disipa como pérdidas por fricción (Steffe, 1996b).

Tabla 1.4-5 Modelos Reológicos

Tipo de fluido	***Modelo***	***Parámetros***	***Nombre***
Plástico real	$\tau=\tau_0+K\gamma^n$		Herschel Bulklei
Plástico ideal	$\tau=\tau_0+\eta_p\gamma$		Bingham
Pseudoplástico	$\tau=K\gamma^n$	n<1	Ostwald Waele
Newtoniano	$\tau=\mu\gamma$		Newtoniano
Dilatante	$\tau=K\gamma^n$	n>1	Ostwald Waele
Tixotropico(dependiente del tiempo	$\tau = A - B * \ln t$	*A* parámetro de fluencia; *B* velocidad del daño	Weltman

Este comportamiento tradicionalmente se ha representado mediante un muelle o resorte (componente elástico), cuyo comportamiento se rige mediante la ley de Hooke, donde σ representa la tensión aplicada, ε representa la elongación y la constante de proporcionalidad viene definida por ξ o módulo elástico; y un amortiguador (componente viscoso) que pueden ser acoplados en serie (modelo de Maxwell) o en paralelo (modelo de Kelvin) o en distintas combinaciones de elementos que puedan describir el comportamiento viscoelástico de un material.

Ecuación 1.1.1-2

$$\text{Componente elástico} \quad \sigma = \varepsilon\xi$$

Ecuación 1.1.1-3

$$\text{Componente viscoso} \quad \sigma = \varepsilon\eta$$

En la Figura 1-5 se ven los elementos mecánicos que representan el comportamiento viscoelástico.

Las propiedades viscoelásticas de los materiales están determinadas por métodos transitorios o dinámicos. Los métodos transitorios incluyen la relajación de la tensión (aplicación de la tensión constante e instantánea y la medición de la tensión en descomposición con respecto al tiempo) y la fluencia (aplicación de la tensión constante e instantánea y la medición de la tensión creciente con el tiempo) (Steffe, 1996b).

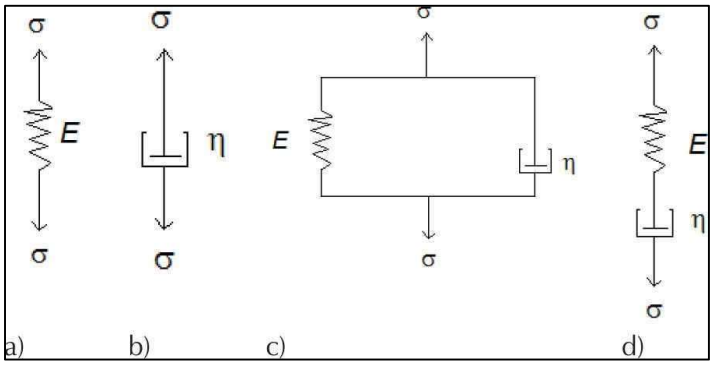


Figura 1-5 Modelos mecánicos de comportamiento viscoelástico, a) muelle; b) amortiguador; c) modelo de Kelvin; d) modelo de Maxwell

En las pruebas oscilatorias, las muestras se someten a pequeñas deformaciones sinusoidales de amplitud, en un instrumento que puede dar tensión sinusoidal al material de prueba y registrar la tensión a partir del material deformado; si los experimentos se llevan a cabo dentro de las regiones visco elásticas, la tensión resultante también fluctuará sinusoidalmente (Gunasekaran & Ak, 2000).

Los ensayos dinámicos permiten determinar la proporción entre el componente elástico y viscoso de un alimento, a través de funciones visco elásticas, tales como el modulo complejo G*, definido, según Gunasekaran & Ak, (2000), como:

Ecuación 1.1.1-4

$$G^* = \sqrt{G'^2 + G''^2}$$

Donde, G' es el módulo de almacenamiento y relaciona los eventos moleculares de naturaleza elástica y G" es el módulo de pérdidas y representa los eventos moleculares de naturaleza viscosa (Gunasekaran & Ak, 2000).

Ecuación 1.1.1-5

$$G' = \left(\frac{\tau_o}{\gamma_o}\right) cos\delta$$

Ecuación 1.1.1-6

$$G'' = \left(\frac{\tau_o}{\gamma_o}\right) sen\delta$$

Donde, τ_0 y γ_0 son respectivamente las amplitudes de las ondas del esfuerzo y de la deformación y δ es el ángulo de desfase; si el fluido es puramente elástico, se cumple que δ =0°, G*=G' y G''=0; en un fluido viscoso ideal δ =90°, G*=G'' y G'=0. Otras funciones visco elásticas son el módulo de viscosidad compleja (η*) y la tangente del desplazamiento de fase o del ángulo de fase, llamado tan δ, es la relación entre la energía perdida y la energía almacenada por ciclo de deformación (Rao, 2007; Steffe, 1996b).

Ecuación 1.1.1-7

$$\tan\delta = \left(\frac{G'}{G''}\right)$$

1.1.18 Herramientas matemáticas

1.1.19 Diseño de experimentos

En la mayoría de las ocasiones y siempre que fue posible, se usó para este trabajo la metodología de Superficies de Respuesta (RSM) que es un conjunto de técnicas matemáticas utilizadas en el tratamiento de problemas en los que una respuesta de interés está influida por varios factores de carácter cuantitativo (Montogomery, 2004).

El propósito de esta metodología es diseñar un experimento que proporcione valores de la variable respuesta y permita determinar el modelo matemático que mejor se ajusta a los datos obtenidos con el propósito de establecer los valores de los factores que optimizan el valor de la variable respuesta (Montogomery, 2004).

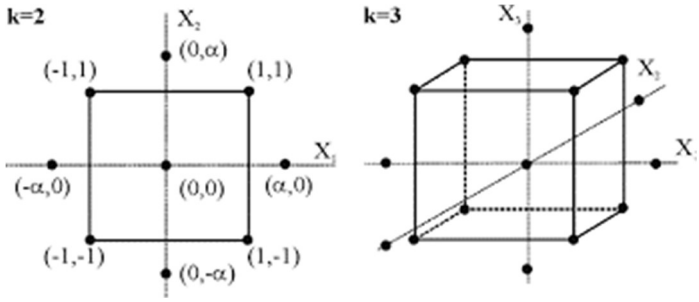


Figura 1-1 Diseño central compuesto para k=2 y k=3

La Figura 1-6 muestra el área explorada por el diseño experimental, que se mueve entre valores mínimos y máximos (-1,1), descritos para las variables de estudio, y permite con un número limitado de experimentos explorar toda una región experimental y lograr mediante las ecuaciones de optimización simular resultados de experimentos que posiblemente no se hagan en la realidad. Es mediante las repeticiones del punto central (valores medios de las variables) que se estima el error y la bondad del ajuste del modelo generado, esto también contribuye a una menor carga experimental al limitar el número de repeticiones de los puntos del diseño (Montogomery, 2004).

El valor real esperado, ***y,*** que toma la variable de interés considerada está influido por los niveles de k factores cuantitativos, X_1, X_2, ..., X_k, esto significa que existe alguna función de X_1, X_2, ..., X_k que proporciona el correspondiente valor de, ***y,*** para alguna combinación dada de niveles de tal forma que la variable respuesta puede expresarse como:

$$y = X\beta + \varepsilon$$

donde ε es el error observado en la respuesta.

La relación y = f (x_1, x_2,... x_k) entre **y**, y los niveles de los k factores x_1, x_2,... x_k representa una superficie. Con k factores la superficie está en k+1 dimensiones. Por ejemplo cuando se tiene y=f(x_1) la superficie está en dos dimensiones, mientras que si tenemos y =f(x_1, x_2) la superficie está en tres dimensiones, la Figura 1-7 representa una superficie que exhibe un máximo (Montogomery, 2004).

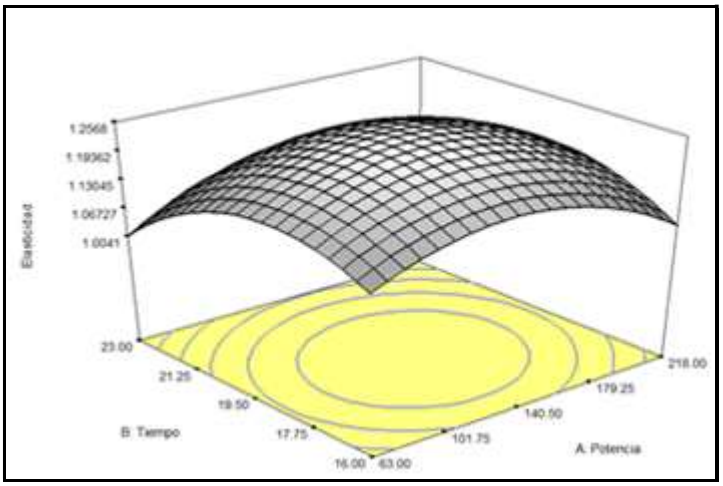


Figura 1-2 Representación gráfica de una superficie de respuesta en tres dimensiones

La función de respuesta se puede representar con una ecuación polinómica y se considerara adecuado el diseño de la superficie, si la respuesta se puede ajustar a un polinomio de primer o segundo grado, de la forma:

Ecuación 1.1.1-1 $$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_1 x_2 + \beta_4 x_1^2 + \beta_5 x_2^2$$

Donde β_0 ,β_1,β_2,β_3,β_4,β_5, son los coeficientes de regresión a estimar, x_1 y x_2 representan los niveles de las variables X_1 y X_2 respectivamente. Al remplazar los coeficientes de regresión por sus estimadores obtenemos:

Ecuación 1.1.1-2 $$yi = \gamma 0 + \gamma 1 x1 + \gamma 2 x2 + \gamma 3 x1 x2 + \gamma 4 x1^2 + \gamma 5 x2^2$$

Donde, y_i, denota el valor estimado de la respuesta Y dado por x_1 y x_2.

Los parámetros del modelo se estiman mediante el método de mínimos cuadrados y una vez que se tienen los estimadores se sustituyen en la ecuación y se obtiene el modelo ajustado.

1.1.20 Teoría de mezclas para el desarrollo de productos

El desarrollo de formulaciones de productos alimentarios tradicionalmente se ha abordado por el método de ensayo y error, que consiste en formular mezclas donde las proporciones de los componentes se establecen de manera arbitraria y se ajusta y selecciona la fórmula que mejor responde a unas condiciones del concepto técnico del producto, sin que se tenga la certeza de que es la óptima, ya que no resulta fácil ni económicamente viable explorar todas las combinaciones posibles de los componentes. Existen otras formas de abordar el problema, por ejemplo, la programación lineal, en donde se formulan matrices de solución a una ecuación objetivo que involucra los

componentes de la formula y sus restricciones tanto técnicas como económicas (Hernández Ayuso, 2007).

Otra aproximación al desarrollo de producto es el uso del diseño experimental en donde se mantiene constante la cantidad total de mezcla y se espera que el valor de la variable respuesta cambie cuando se realizan cambios en las proporciones de los componentes que la conforman, está estrategia se denomina diseño de mezclas, que es una metodología estadística que surgió a partir de la teoría de mezclas de Scheffer en 1958, y ha sido utilizado en la optimización de formulaciones de alimentos, pinturas, polímeros, asfalto, concreto, vidrio, cerámica, medicamentos, entre otros (Pinillos & Lopera, 2009).

Un diseño de experimentos con mezclas, consiste en probar mezclas de los ingredientes, en donde las proporciones en las que participan los componentes de la mezcla (Y), deben satisfacer la restricción de que; $1 \geq Y \geq 0$. Esta restricción indica que la suma de las fracciones de todos los componentes que integran la mezcla debe ser 1, esto significa que los componentes no pueden ser manipulados independientemente unos de otros, y que sus proporciones deben variar entre 0 y 1 (Ortega-pérez, Bustamante-Rua, Gutiérrez-Rôa, & Correa-Espinal, 2015).

Sin embargo, existen situaciones donde algunas proporciones no pueden variar entre 0 y 1, porque algunas o todas las proporciones de los componentes están restringidas por límites inferiores y/o límites superiores, que restringen a los componentes de forma individual, puede que exista cierta dependencia entre dos o más componentes y sea necesario utilizar restricciones lineales de multicomponentes, que ponen límites a las funciones. Por otro lado, es posible que se desee mantener fija cierta parte de la mezcla, entonces las proporciones deben ser escaladas, de tal forma que sumen la unidad (Pinillos & Lopera, 2009).

Al planear un experimento con mezclas se decide, con base en el conocimiento no estadístico y el objetivo del problema. Los diseños de experimentos con mezclas distribuyen adecuadamente las mezclas en la región experimental, la cual se representa con figuras geométricas de componentes. Así para dos componentes la región experimental es un segmento de recta, para tres un triángulo, para cuatro un tetraedro y para más de cuatro un híper tetraedro (Montogomery, 2004).

Los puntos del diseño consisten en todas las posibles mezclas que se forman con el número de componentes de la mezcla. Este diseño incluye básicamente puntos en los bordes, para hacer predicciones en el interior se agrega un punto centroide global y las mezclas localizadas entre el centroide y los vértices.

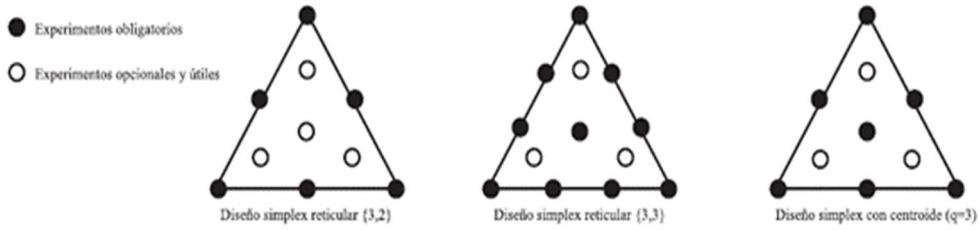


Figura 1-1 Representación de la zona experimental para tres componentes
Adaptado: (Pinillos & Lopera, 2009)

La Figura 1-6 muestra los dos tipos básicos de diseño que son el simplex reticular y simplex con centroide. El diseño simplex con centroide se aplica cuando se tienen pocos componentes y consiste en, las mezclas puras, todos los puntos medios de las aristas definidas por cada dos vértices, los centroides de las caras definidas por cada tres vértices y así hasta obtener el centroide global, tal como se ilustra en la figura, sin embargo, cuando existen restricciones adicionales, ya sean límites inferiores y/o superiores o restricciones lineales, la región experimental ya no es regular y su forma depende de la ubicación de las restricciones.

Después de recolectar los resultados de los experimentos definidos en el plan experimental, es necesario ajustarlas a un modelo estadístico para investigar el efecto de los componentes sobre la respuesta. Para ello se utilizan los modelos canónicos de primer, segundo o tercer orden cuyas ecuaciones se describen en la Tabla 1.5-1.

Tabla 1.5-1 Modelos canónicos (Montogomery, 2004)

Modelo canónico de primer orden(Lineal) $$y = \sum_{i=1}^{q} \beta xi$$
Modelo canónico de segundo orden (cuadrático) $$y = \sum_{i=1}^{q} \beta xi + \sum_{i<j} \sum_{j=2}^{q} \beta ijxixj$$
Modelo canónico de tercer orden (cubico) $$y = \sum_{i=1}^{q} \beta xi + \sum_{i<j} \sum_{j=2}^{q} \beta ijxixj + \sum_{i<j} \sum_{j<k} \sum_{k=3}^{q} \beta\, ijkxixjxk$$

Los parámetros del modelo se estiman utilizando el método de mínimos cuadrados y la selección del modelo se hace en función de la cantidad de puntos experimentales, la prueba de falta de ajuste y el resumen de estadísticos. Una vez se tiene modelada la respuesta, se genera una ecuación de optimización posible dentro de la región experimental utilizada para ajustar el modelo; lo que permite encontrar la composición de la mezcla que corresponda a un perfil de respuesta óptima.

La naturaleza de las respuestas para la optimización es diversa, puede ser desde el nivel de aceptación sensorial, hasta parámetros asociados al comportamiento reológico o la composición referida a compuestos de interés tal como el contenido de antioxidantes o el nivel de proteínas. La Figura 1-9 muestra el comportamiento de una variable de respuesta con relación a la composición de la mezcla en dos formas de visualización, como una gráfica de contorno y como una superficie de respuesta.

También se puede cuantificar la influencia que tienen los diferentes componentes sobre la respuesta, tanto en forma individual como en su acción conjunta con otros componentes, en este caso, en función de su signo se puede determinar si existe sinergismo o antagonismo entre los componentes.

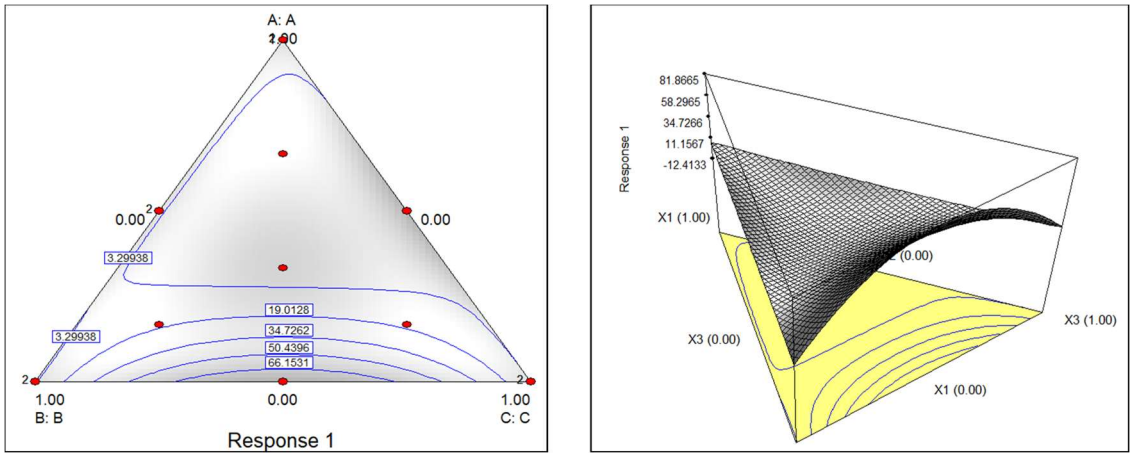


Figura 1-2 Visualización de resultados en software Desing expert®

Para aplicar esta metodología puede usarse el paquete estadístico Desing expert® que permite una fácil visualización de los resultados, el análisis estadístico y la manipulación de los modelos para eliminar aquellos términos que ocasionan una falta de ajuste.

1.1.21 Modelado y simulación

Los modelos buscan representar fenómenos o relaciones entre ellos a través de una formulación matemática y la simulación matemática consiste en experimentar con los modelos, asignando valores a las variables de entrada y observando los valores de las de salida. En el procedimiento de selección de modelos se evalúa un conjunto de modelos posibles y se realiza la estimación de parámetros en función de las estimaciones ponderadas de dicho parámetro en los diferentes modelos. Se busca la mejor explicación posible para los datos observados y por lo tanto se prueba el ajuste por regresión entre los datos observados y los datos predichos por la aplicación del modelo (Hair, Tatham, Anderson, & Black, 1998).

Un modelo matemático es un conjunto de fórmulas y/o ecuaciones basadas en una descripción cuantitativa de un fenómeno real, y creadas con la intensión de que el comportamiento que predicen se parezca al comportamiento real en el que se ha basado. Las cantidades matemáticas en los modelos se pueden clasificar en variables, constantes, parámetros y funciones de entrada.

Una variable independiente es una cantidad que toma valores dentro un rango o dominio. Por lo general, las variables independientes son mediciones del tiempo o de posición. El conjunto de todos los valores que puede tomar la variable independiente es el dominio del problema (Montogomery, 2004).

Una variable dependiente es una cantidad que cambia durante un problema dado, dependiendo del o los valores de la o las variables independientes. Una constante es una cantidad que tiene un solo valor fijo propio del modelo y asociado a su formulación. Un parámetro es una cantidad cuyo valor está determinado para todo el dominio del modelo, pero que puede variarse para dar una familia de problemas similares. Los parámetros son de cierta manera los componentes más importantes de un modelo matemático, y son aquellos que se estiman con base en la serie de datos experimentales que se pretenden describir con el modelo (Hair et al., 1998).

En la Tabla 1.5-2 muestran algunos de los modelos usados en este trabajo, con la descripción de los parámetros a determinar sobre las distribuciones de datos obtenidas en cada tipo de determinación.

Tabla 1.5-2 Algunos modelos usados en ese trabajo

Fenómeno	***Modelo***	***Parámetros***	
Comportamiento reológico dependiente del tiempo	$\tau = A - B * \ln t$	*A* parámetro de fluencia; *B* velocidad del daño	Weltmann
Comportamiento cinético-producción	$\frac{Y(t) - Ye}{Yo - Ye} = exp^{-\left(\frac{t}{\alpha}\right)^{\beta}}$	β parámetro de forma α parámetro de velocidad	Weibull
Comportamiento cinético de reacciones	$\frac{dQ}{dt} = kQ^n$	*Q variable* medible *K* constante cinética n orden de reacción	Modelo cinético
Dependencia de la temperatura	$k = Ae^{-Ea/RT}$	E_a Energía de Activación	Arrhenius
Isotermas de sorción Humedad en el equilibrio	$X = \frac{Xm.C.k.aw}{(1 - k.aw).(1 + (C - 1)k.aw)}$	Xm Agua en La Monocapa C y k cte. relacionadas con el Calor de sorción	GAB (Guggenheim, Anderson y De Boer)

CAPÍTULO 2- Materiales y Métodos

Equipo de Ultrasonido

2 Materiales y métodos

2.1.1 Materiales

2.1.2 Materiales para ensayos de coagulación

Leche semidescremada pasteurizada a baja temperatura (LTST 75°C 20s) de marca comercial, fue adquirida en el mercado local. La Tabla 2.1-1 describe la composición en lípidos y proteínas.

Tabla 2.1-1. Composición leche semidescremada

Composición	*Contenido g/100ml*
Lípidos	1,6
grasa saturada	1,0
Carbohidratos totales	5,1
azucares	5,1
Proteínas	3,4

Cloruro de calcio ($CaCl_2$) Merck® grado reactivo analítico N° CE 233-140 de 95% de pureza.

Renina origen microbiano (Coalho líquido Britex®) de *Mucor miehei*, proteasa de tipo ácido (EC: 3.4.23.10)

2.1.3 Materiales para desarrollo de productos

Leche cruda adquirida con un proveedor local, descremada en descremadora de laboratorio Elecrem® con capacidad de 125L/h y velocidad 8000 RPM, para obtener leche descremada con 0,5% de materia grasa.

Cultivo starter génesis ® CM2 de *Lactococcus lactis, Lactococcus cremoris, Lactococcus dyacetilactis y Streptococcus termophilus* con una concentración de $1x10^9$ UFC/g.

Pulpa de curuba (*Pasiflora mollissima Kunt LH. Bailey*.) fruto originario de Suramérica, se usó en este estudio, la Figura 2-1 muestra las características exteriores del fruto, la pulpa se obtiene por desintegración y tamizado a partir de frutos maduros, luego congelación a -18°C hasta su uso, previa pasteurización a 70°C y 20 min. El análisis fisicoquímico muestra un contenido de solidos solubles entre 8-10°Brix, pH 2,8-3,5, acidez expresada como ácido cítrico 1,2 a 1,5%. La pulpa después de la pasteurización y antes del almacenamiento en congelación presento un recuento de mesófilos aerobios <300 UFC/g, recuento coliformes totales <10 UFC/g, recuento de

esporas de *Clostridium* sulfito reductor < 10 UFC/g, recuento de hongos y levaduras < 200 UFC/g.

Figura 2-1 Frutos maduros de curuba (*Pasiflora mollissima*)

Aislado de proteína de suero (WPI) de Hilmar® USA adquirido de un proveedor local se usó en este estudio. El WPI es un polvo blanco cremoso fácilmente dispersable, que está disponible comercialmente como WPI 9010 Instantised. El certificado de análisis recibido del fabricante registra contenidos de grasa, ceniza y humedad de 1.5%, 2,55% y 5.57% (p / p), respectivamente. El contenido de proteína (6.38 × N) del polvo de WPI es de 91,7% (p / p; base seca), el contenido de lactosa es 1%. La composición típica es: β-lacto globulina (71.0%; la relación de monómero a dímero es 5: 1), α-lacto albúmina (18.0%) y albúmina de suero bovino (BSA, 6.0%). Las soluciones de WPI al 10% en agua des ionizada tienen un pH de 6,32

Concentrado de proteína de suero (WPC) de Hilmar® USA adquirido de un proveedor local se usó en este estudio. El WPC es un polvo blanco cremoso fácilmente dispersable, que está disponible comercialmente como WPC 8200 Heat stable/ Gelling. El certificado de análisis recibido del fabricante registra contenidos de grasa, ceniza y humedad de 5,9%, 2,32% y 5,77% (p / p), respectivamente. El contenido de proteína (6.38 × N) del polvo de WPC es de 83% (p / p; base seca), el contenido de lactosa es 5%. Las soluciones de WPC al 10% en agua des ionizada tienen un pH de 6,06

Carragenina de Gelymar-Chile® fue adquirida en el mercado local. Conocida comercialmente como CarrageLact, es una mezcla de Carragenina Kappa II y Carragenina Iota.

Estevia en forma de un polvo blanco soluble se usó como edulcorante, adquirida con un proveedor local de la compañía Tate & Lyle, conocido en el mercado como tasteva® en concentración de 300mg/L

Sabor a vainilla Firmenich® 30mg/L, fue aplicando según la recomendación del fabricante.

2.1.4 Equipos de tratamiento

2.1.5 Equipo de alta presión

El equipo usado es un Hiperbaric 55, que tiene una presión máxima de trabajo: 600 MPa. en un rango de temperatura: 5 a 25ºC, longitud interna de: 2000 mm., diámetro interno del recipiente: 200 mm. que usa como fluido de presurización: agua del grifo. Prensa hidrostática (Hiperbaric 55, Hiperbaric, Burgos, España). Está conectado a una unidad de refrigeración (RMA KH 40 LT, Ferroli, San Bonifacio, Italia) que permite controlar la temperatura del agua de entrada utilizada como fluido de presurización, ubicado en el laboratorio de alta presión de la universidad de Aveiro-Portugal, que fue cargado con las muestras de leche empacadas en botellas PET de 250 ml, las que después del tratamiento se almacenaron a 4°C por un periodo máximo de 24 horas hasta la coagulación, como control se usó la misma leche sin tratamiento de presión.

2.1.6 Equipo de ultrasonido de potencia o de baja frecuencia

Para el tratamiento con ultrasonido se utilizó el equipo Hielscher Ultrasonics® UP400S (Teltow, Alemania) de 24 kHz y 400 W de potencia máxima el cual trabaja con un sonotrodo de titanio de 2.2 cm de diámetro con una densidad de potencia acústica de 85 W/cm^3; ubicado en la Planta Piloto de la universidad Jorge Tadeo Lozano. Con el fin de controlar el aumento de temperatura por efecto de la cavitación producida durante cada experimentación, fue necesario adaptar al equipo un baño de hielo. Los tratamientos con ultrasonido se llevaron a cabo en un vaso de precipitado de 2000 ml y el volumen a tratar de leche pasteurizada fue de 1000 ml, este volumen se mantuvo constante para cada experimento. Para no afectar el tratamiento por la geometría del sistema, se adaptó un soporte fijo en altura y posición respecto al sonotrodo. En la Figura 2-2 se observa el montaje del equipo de ultrasonido con las condiciones de operación ajustadas para minimizar el efecto de la geometría y la temperatura.

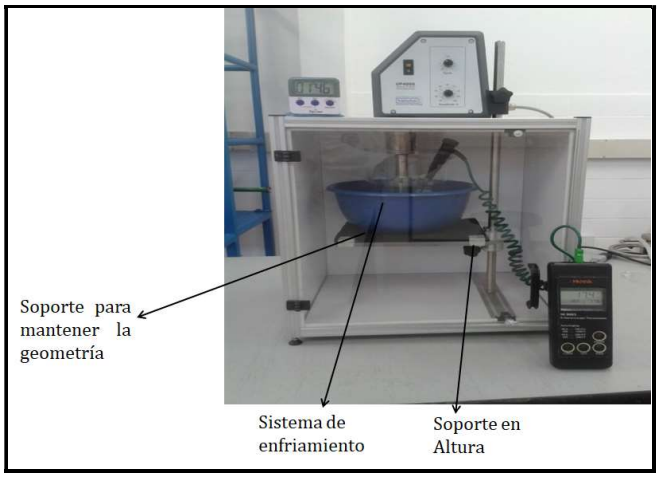


Figura 2-2 Equipo de ultrasonido y su adaptación

2.1.7 Métodos

2.1.8 Diseño de Experimental

2.1.8.1 Diseño experimental para tratamientos de alta presión

Para establecer el efecto de las condiciones de operación sobre la coagulación y la textura en la producción de queso fresco, se utilizó un diseño factorial completo. El diseño experimental consta de un bloque conformado por los puntos factoriales y tres repeticiones de cada punto para un total de 18 experimentos, más un blanco sin tratamiento, al interior del bloque los experimentos se realizaron de forma aleatoria.

Como variables de diseño se consideraron la presión en niveles de 200, 400 y 600 MPa, y el tiempo de aplicación en niveles de 15 y 30 minutos, como variables de respuesta se consideraron, el rendimiento quesero, la proteína soluble, la humedad, las propiedades texturales, la sinéresis, los resultados FTMIR; la hidrofobicidad superficial (Ho), las isotermas de sorción, la mono capa (Mo), el calor isostérico (q_{st}) y la microestructura SEM.

Los valores experimentales de las variables de respuesta se ajustaron mediante un polinomio de segundo orden de la forma:

Ecuación 1.1.1-1

$$yi = \gamma 0 + \gamma 1x1 + \gamma 2x2 + \gamma 3x1x2 + \gamma 4x1^2 + \gamma 5x2^2$$

Donde y_i es la variable de respuesta, γ_0 es el intercepto, γ_1, γ_2 son los coeficientes lineales, γ_3 es el factor que representa la interacción entre las variables, y γ_4, γ_5 son los coeficientes cuadráticos (Montgomery 2004).

2.1.8.2 Diseño experimental para los tratamientos de Ultrasonido

Para el desarrollo de la fase experimental se utilizó un diseño de superficie de respuesta tipo Central Compuesto (CCD). El diseño experimental consta de 4 puntos factoriales del diseño y 5 repeticiones en el punto central. El número total de corridas del diseño es de 13 (Montogomery, 2004).

Se incluyó para efectos de comparación un blanco sin tratamiento y los experimentos fueron llevados a cabo de manera aleatoria con el fin de reducir los efectos de factores externos al proceso. Las variables independientes del diseño fueron, la potencia y el tiempo; Las variables de respuesta sobre las cuales se evaluó cada tratamiento fueron, el rendimiento quesero (%), la proteína soluble determinada en el suero (mg/mL), la humedad (%), textura TPA, la sinéresis, la diferencia de color, el espectro FTMIR y el tamaño de partícula.

A partir de este diseño se obtuvo un polinomio de segundo grado de la forma:

Ecuación 1.1.1-2

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_1 x_2 + \beta_4 x_1^2 + \beta_5 x_2^2$$

Donde y es la variable de respuesta, β_0 es el intercepto, β_1 y β_2 son los coeficientes lineales, β_3 son los factores que representan la interacción entre las variables y β_4 y β_5 son los coeficientes cuadráticos, el análisis estadístico se realizó con Design-Expert® 8.0.7.1.

2.1.8.3 Diseño experimental para estudiar el efecto de alta presión sobre cinética de fermentación.

Para establecer el efecto de las condiciones de operación sobre la cinética de fermentación y La textura en la producción de queso tipo *Petit Suisse*, se utilizó un diseño tipo central compuesto (CCD). El diseño experimental consta de un bloque conformado por los puntos factoriales y 5 repeticiones de punto central y 4 puntos axiales o puntos estrellas. Así para un total de 13 experimentos, al interior del bloque los experimentos se realizaron de forma aleatoria. Como variables de diseño se consideran la Presión en niveles de 200 y 600 MPa, y el tiempo de aplicación en niveles de 10 y 30 minutos, como variables de respuesta se consideran los parámetros de los modelos ajustados.

Ecuación 1.1.1-3

$$x = \frac{Xi - Xpromedio}{\Delta X}$$

Ecuación 1.1.1-4

$$\Delta X = \frac{Xmax - Xprom}{\sqrt{2}}$$

Donde Xes el valor de la variable para cada punto del diseño.

Como variables de respuesta se consideran la cinética de fermentación y se ajustan los datos de acidez al modelo de Weibull, para obtener los parámetros α y β, y la viscosidad, se ajustaron los datos del esfuerzo cortante en función del tiempo al modelo de Weltmann y se obtuvieron los parámetros A y B.

Los valores experimentales de las variables de respuesta se ajustan mediante un polinomio de segundo orden.

2.1.8.4 Diseño experimental para estudiar el efecto de HHP y UP en el desarrollo de geles proteicos.

Para establecer el efecto de las condiciones de pretratamiento por UP y gelificación por HHP sobre el comportamiento reológico, la respuesta sensorial y la microestructura en la producción de geles, se utiliza un diseño factorial.

Como variables de diseño se consideran la Presión en niveles de 400 y 600 MPa, y el tiempo de aplicación en niveles de 5 y 15 minutos, El tratamiento de ultrasonido se fija en 173 W y 6 minutos con base en los resultados previos y en el diseño se considera la aplicación o no como pretratamiento a la alta presión. Para un total de 8 combinaciones más sus respectivos triplicados.

2.1.9 Proceso de coagulación

Después del tratamiento correspondiente, la leche se calentó a 35 ° C y se llevó a cabo la adición y solubilización de Cloruro de Calcio utilizando una concentración de 250 ppm (Pardo & Almanza, 2003).

Con el ánimo de minimizar el efecto de las operaciones de cuajado y corte de la cuajada sobre las variables de respuesta, se implementa un sistema de coagulación y corte teniendo siempre el mismo tamaño de grano, por lo tanto, se estima que los cambios reportados tanto en el rendimiento como en la humedad responden al tratamiento aplicado.

Posteriormente se añadió renina de origen microbiano (Coalho líquido Britex®) en proporción del 0,1% para completar la etapa correspondiente a la coagulación. El tiempo de coagulación está afectado por características como la composición de la leche y las condiciones de procesamiento previo, con el fin de estandarizar esta condición en el proceso el tiempo de coagulación fue de 30 minutos se registró la temperatura para controlarla dentro de un rango de 35 – 37ºC (Pardo & Almanza, 2003). Al cabo de los 30 minutos se retiró el molde del baño y se realizó el corte.

En la Figura 2-3 se puede ver el montaje para mantener constante la temperatura de coagulación, la Figura 2-4 muestra el molde usado para estandarizar las características de los quesos prensados.

Figura 2-3 Montaje para la coagulación

El corte de la cuajada se estandarizó a un tamaño de grano de 5 mm por la implementación de una lira de corte y manteniendo el número de pasada y la dirección constantes en todos los ensayos, con el fin de no alterar por este factor las propiedades de sinéresis del coagulo, el tiempo de desuerado fue de 1 hora; al cumplir el tiempo de

desuerado se filtró el suero de la cuajada con la ayuda de un lienzo dejándolo escurrir durante 90 minutos.

Para facilitar la separación del suero, la cuajada se transfirió a moldes de aluminio, perforado (Ø 6 cm, altura 4,5 cm) Figura 2-4, revestidos con un paño de algodón y se permitió que el drenaje se facilitara por su propio peso. Para completar el desuerado se aplicó presión de 1 Kg durante 24 horas manteniendo a 4°C. Los quesos frescos fueron desmoldados y almacenados a 4 °C por un periodo máximo de 4 días para la medición de las propiedades fisicoquímicas y texturales.

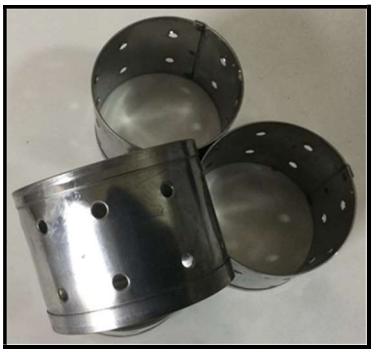


Figura 2-4 Moldes para quesos frescos

Los ensayos de coagulación generaron 3 tipos de muestra para la medición de características moleculares, la leche tratada, las proteínas insolubles (queso) y las proteínas solubles (suero) estas muestras fueron liofilizadas y almacenadas para su posterior análisis.

2.1.9.1 Evaluación del rendimiento quesero

El rendimiento quesero se mide por la elaboración de un balance de masa tanto en base seca como en base humedad del proceso, para lo cual se obtienen los pesos en gramos de todo el material usados durante la elaboración del queso fresco. El rendimiento se calcula teniendo en cuenta el peso de la leche procesada y el peso final de la cuajada.

Ecuación 1.1.1-1

$$\%\ Rendimiento\ = \frac{Queso\ Fresco\ (g)}{Leche\ utilizada\ (g)} * 100$$

2.1.9.2 Determinación de Humedad

La determinación de humedad se realizó por medio del método de sólidos totales y humedad de acuerdo con el método 925.10 de la AOAC (AOAC, 2000), consiste en una determinación gravimétrica por diferencia de pesos de la muestra antes y después de secarla a una temperatura de 102ºC hasta peso constante, los sólidos totales (ST) resultan de la diferencia del peso de la muestra fresca menos la humedad.

2.1.9.3 Determinación de Proteínas

Para evaluar la posible migración de proteínas solubles e insoluble en las dos fracciones del proceso de coagulación, se realizó un análisis de nitrógeno total N por la metodología de análisis elemental basada en el método de combustión de Dumas (Müller, 2017) en un equipo LECO CHNS-932 (LECO, USA).

La determinación de proteína en el suero de las muestras tratadas por ultrasonido se realizó por el método espectrofotométrico de Bradford basado en el cambio de absorbancia a 595nm de una solución ácida de Serva Blue G 250 al interactuar con la proteína en solución (Damodaran et al., 2008).

Las absorbancias se determinaron en espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda® 25 UV/Visible. Los rangos de sensibilidad que maneja este método van desde 25 µg/mL hasta 200 µg/mL de proteína en solución.

Las muestras de suero fueron preparadas para el análisis centrifugándolas a 5000 rpm durante 15 minutos y finalmente realizando diluciones de 1:10 de las muestras obtenidas para cada tratamiento. Las absorbancias se midieron por triplicado, a continuación, se muestra la curva de calibración, que se realizó a partir de Albumina Sérica Bovina (BSA) en concentraciones de 2.5; 5; 7.5;10 y 12.5 mg/mL.

En la Figura 2-5 la curva de calibración con la ecuación de regresión para el cálculo de la concentración de proteínas con base en la lectura de absorbancia.

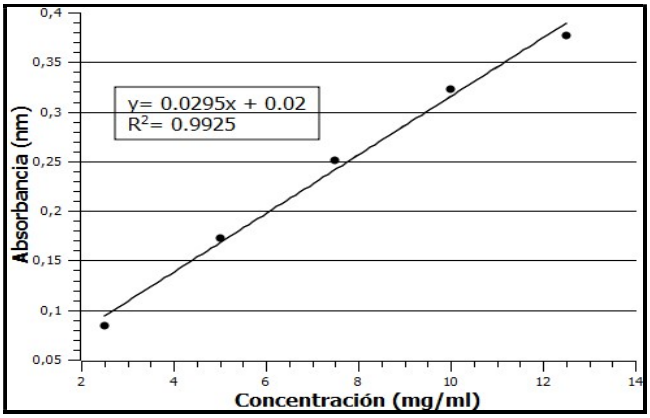


Figura 2-5 Curva de calibración BSA

2.1.9.4 Análisis de textura

Para realizar la prueba de TPA a las muestras de queso fresco se utilizó un texturómetro Stable Microsystem TA-HD®, el ensayo se realizó a temperatura ambiente (20±1 °C), las muestras se cortaron en cilindros de 2 cm de diámetro y 4 cm de altura en sitios aleatorios de la superficie de queso evitando los bordes, a partir de cada queso se obtuvieron entre 7 y 10 probetas para ensayo.

Se aplicó una prueba de doble compresión uniaxial a una velocidad constante, con una traza de compresión del 25% con respecto a la altura inicial del producto y con una velocidad de descenso de 30 mm/min. Las muestras se comprimieron usando una sonda cilíndrica de acero inoxidable (6 mm de diámetro, 60 mm de altura) equipada con una celda de carga de 500 N. Para todas las muestras, el tiempo de contacto antes del ensayo fue de 5 segundos y se realizaron 5 repeticiones de cada muestra.

El equipo registró automáticamente la fuerza ejercida sobre el producto y con los datos obtenidos se calcularon los parámetros de textura a partir de las curvas de fuerza (N) x tiempo (s) generadas durante el ensayo, con el software Texture Expert®.

En la Figura 2-6 se puede observar el instrumento de corte y el tamaño de las probetas ubicadas en la plataforma del equipo de medición.

Figura 2-6 Corte de probetas para análisis TPA

2.1.9.5 Determinación de Sinéresis

Para medir la capacidad de retención de suero por parte de la cuajada preparada con leche tratada por ultrasonido, se determinó la sinéresis pesando aproximadamente 9 gramos de queso que fueron puestos en bolsas selladas y expuestas a 35°C en un

baño termostático durante 24 horas; al cabo de este tiempo se midió el volumen de suero drenado y se expresó como porcentaje del peso de la muestra.

2.1.10 Isotermas de adsorción

Las humedades de equilibrio de las muestras liofilizadas de leche tratada por HHP a diferentes actividades de agua y temperaturas (15,25,40°C) se determinaron mediante el método estático descrito por (Gálvez, Aravena, & Mondaca, 2006). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado utilizando 0,5 g de muestra previamente liofilizada a -50 ºC y una presión de 10^{-2} Pa en un equipo Labconco™ de 4.5 Litros. Las determinaciones se realizaron en un rango de actividad de agua de 0,10 a 0,90 utilizando disoluciones salinas saturadas (Soteras et al., 2014).

Las sales fueron KOH, LiCl, $MgCl_2$, K_2CO_3, $Mg(NO_3)_2$, NH_4NO_3, NaCl, KCl y $BaCl_2$, cada disolución saturada se introdujo en un frasco herméticamente cerrado, junto con viales que contenían la muestra, para actividades de agua superiores a 0,6 se introdujo también, en cada frasco, otro vial que contenía timol para evitar el crecimiento microbiano (Gil et al., 2013a).

Los frascos cerrados se introdujeron en una estufa de convección Thermo Scientific™ Heratherm™ a la temperatura requerida. El equilibro entre la muestra y el ambiente del frasco se alcanzó cuando las variaciones de peso fueron menores de 0,1%.

La determinación de la humedad se realizó según el método de la AOAC(AOAC, 2000), mediante la determinación de la masa de la muestra antes y después de ser deshidratada en estufa de vacío Thermo Scientific™ VT6060 a 60 ºC hasta alcanzar peso constante (variaciones de peso menores del 0,1% del peso). Estas determinaciones se realizaron por triplicado.

2.1.10.1 Modelado de las isotermas de adsorción

Los datos experimentales de humedad en cada uno de los pseudoequilibrios se ajustó al modelo de GAB (Guggenheim, Anderson y de Boer), (Gil et al., 2013a), para comparar su comportamiento e interpretar los resultados. El ajuste de las ecuaciones a los datos experimentales de las isotermas de sorción se realiza mediante la herramienta de optimización no lineal Solver de Microsoft Excel 2007 (Microsoft, Redmond, WA, USA).

Ecuación 1.1.1-1

$$X = \frac{Xm.C.k.aw}{(1-k.aw).(1+(C-1)k.aw)}$$

Donde: ***X***: contenido de humedad, Kg agua/ Kg masa seca, ***Xm***: Contenido de humedad de mono capa, ***C***: constante de Guggenheim, característica del producto y relacionada con el calor de adsorción de la monocapa, ***K***: factor de corrección relacionado con el calor de sorción de la multicapa, ***aw***: actividad de agua.

Para el cálculo del calor isostérico se utiliza la ecuación de Clausius Clapeyron. Ecuación 2-6 y 2-7 Se graficó –ln (aw) contra 1/T para valores fijos de humedad. Se realiza un ajuste lineal de las rectas y de la pendiente se obtiene el calor isostérico neto de sorción (*qst*) para cada valor de la humedad.

Ecuación 1.1.1-2

$$qst = -R\frac{dlnaw}{d(\frac{1}{T})}$$

Ecuación 1.1.1-3

$$qst = Qs - \Delta Hv$$

Donde: *qst*: calor isostérico neto de sorción a contenido de humedad constante, *Qs*: Calor de sorción total, *ΔHv*: Calor latente de vaporización, *R*: constante universal de los gases ,T: temperatura absoluta.

2.1.11 Medición del tamaño de partícula (DLS)

Una porción de las muestras tratadas fue diluida al 10% con agua destilada y des ionizada para facilitar la medición. Las mediciones de tamaño de partícula fueron realizadas en un equipo de dispersión dinámica de luz (DLS) láser, Zeta Sizer Nanoestructura–Zs de Malvern Instruments (Malvern, Inglaterra) provisto de un láser He–Ne (633 nm) y un correlator digital, modelo ZEN3600. Las mediciones fueron realizadas a un ángulo de dispersión de 173 º, el rango de medición del equipo es 0,6 – 6000 nm. Se realizaron mediciones de tamaño de partícula a temperatura ambiente y llevaron a cabo tres determinaciones por muestra. Simultáneamente al tamaño de partícula también se midió el potencial zeta, que es indicativo de la carga superficial de la partícula.

2.1.12 Hidrofobicidad superficial

La hidrofobicidad superficial (H_o) fue medida a 25 °C según el método descrito por (Alizadeh-Pasdar et al., 2000) usando 1–anilinonaftaleno–8–sulfonato (ANS) y 6-propionil-2- (N,N-dimetil amino)naftaleno (PRODAM) como sondas de fluorescencia. La muestra de proteína se disolvió en buffer fosfato de potasio 0,1 M pH 7 a una concentración de 0,4 %, luego se hicieron diluciones seriadas en el buffer de disolución de la muestra, en concentraciones comprendidas entre 0,1 – 0,4 % p/p, se adicionaron 10 µl de ANS (8,0 mM en buffer fosfato 0,01 M, pH 7) y se midió el valor de la intensidad de fluorescencia de cada dilución con excitación a λ = 365 nm y emisión a λ = 484 nm en un espectrofotómetro de fluorescencia Hitachi F–2000 (Japón).

La intensidad relativa de fluorescencia neta para cada concentración de proteína se registró como la diferencia entre las intensidades medidas para cada solución con sonda y un blanco sin sonda. La hidrofobicidad superficial (H_0) de la proteína es el valor de la pendiente del gráfico de intensidad relativa de fluorescencia neta en función de la concentración de la proteína (% p/v) y se calculó por análisis de regresión lineal (Alizadeh-Pasdar et al., 2000). Cada H_o corresponde al promedio de tres repeticiones.

2.1.13 Determinación de Color

La medición del color en los quesos obtenidos se realizó utilizando un colorímetro Hunter Lab Konica Minolta®; el cual maneja la escala *Hunterlab* y que permite identificar estímulos de color en un espacio tridimensional. L* representa la luminosidad y va de negro a blanco, a* es la diferencia entre el rojo (100) y el verde (-100) y el b* la diferencia entre amarillo (100) y azul (-100).

La expresión de color se hace como la diferencia de los estímulos contra un patrón, expresado como se ve en la ecuación:

Ecuación 1.1.1-1 $$\Delta E = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2}$$

2.1.14 Análisis Infrarrojo con transformada de Fourier (FTMIR)

Para el análisis se usó un equipo Infrarrojo marca Bruker® serie Alpha (Bruker Corporation, Alemania) equipado con un accesorio de ATR con cristal de diamante de una reflexión. Las muestras liofilizadas fueron molturadas en un mortero de ágata y colocadas sobre el cristal para el barrido usando el aditamento de compresión del equipo para asegurar un mejor contacto de la muestra. Cada espectro fue adquirido por

acumulación de 256 scans con resolución 4 haciendo ajuste de la línea base (background) entre cada lectura. Para el análisis se hizo el promedio de tres espectros por muestra y en caso necesario los espectros fueron repetidos hasta asegurar un mínimo de ruido y mayor repetitividad.

Con el propósito de eliminar las interferencias ocasionadas por las altas concentraciones de lactosa en el suero, las muestras fueron sometidas a diálisis, separando por difusión selectiva a través de una membrana semipermeable. Las muestras de suero liofilizadas, provenientes de los procesos de coagulación se re disolvieron en agua destilada y se colocaron dentro de una membrana de diálisis (Thermo Scientific 69100, Snake skin Dialysis tubing,10000 MWCO,22mm) sumergidas en 5 litros de agua destilada por cada 5 ml de solución, manteniéndolas en refrigeración con agitación constante y cambiando el agua de diálisis hasta en 6 ocasiones durante un periodo de 24 horas, la disminución del contenido de lactosa se monitoreo por la desaparición del pico especifico, en infrarrojo medio, a 1076 cm^{-1} .

2.1.14.1 Manejo de los datos de infrarrojo Medio

El estudio de la vibración de grupos funcionales específicos es lo que permite el estudio de las moléculas por infrarrojo, en el caso de las proteínas el más característico y abundante es el grupo Amida que conforma el enlace peptídico, en particular se empleó la región Amida I que corresponde a la vibración del enlace C=O (estiramiento) que es sensible a los cambios que el enlace peptídico adopta y por lo tanto a la estructura secundaria de la proteína. Las asignaciones de banda de la banda amida I (1600 a 1700 cm^{-1}) se basaron en asignaciones de bandas de los estudios espectroscópicos de infrarrojo en la literatura (Dzwolak, Kato, & Taniguchi, 2002; Fonseca et al., 2012; Kong & Yu, 2007b).

Para mejorar la interpretación de los espectros y minimizar la superposición de picos, se usan procesos de desconvolución y/o determinación de la segunda derivada del espectro. En este trabajo fue utilizada la segunda derivada, que permite visualizar las bandas subyacentes que componen la banda del espectro original. Los picos presentan mínimos en la posición de los máximos del espectro original y al multiplicar la segunda derivada del espectro por *-1,* los máximos coinciden con el espectro original, como se puede ver en la Figura 2-7

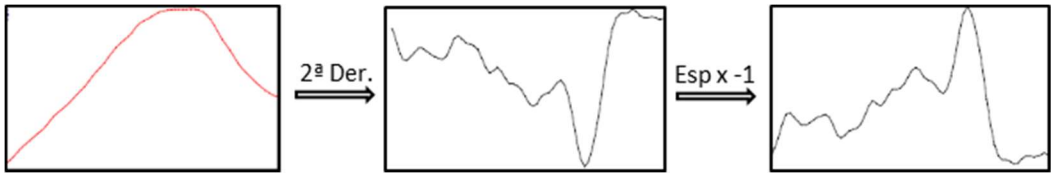


Figura 2-7 Utilización de la segunda derivada para identificar bandas y picos que componen una banda espectral.

Con la información de las segundas derivadas de los espectros se identificaron las estructuras secundarias, tal como están descritas en la tabla 2.3-1

Tabla 2.3-1 Asignación de estructuras secundarias en rangos de longitud de onda en cm^{-1} para la región Amida I

	hélices		lámina beta		giros	estructuras
referencias	alfa	3₁₀	paralelas	antíparalelas	reversos	desordenadas
Arrondo et al.(1999)	1655-1648		~1630 ~1645 1640-1625	1636-1630 1693-1690		1660-1656
Tamm y Tatulian(1997)	1660-1648	1670-1660			1685-1660	1660-1652
Dong et al. (1990)	1658-1654		1695-1675 1643-1623		1690-1665	1651-1640
Kumosinski y Unruh(1996)	1660-1650		1638-1624		1695-1670	1648-1642
Pelton y McLean(2000)	1657-1650		1649-1626	1640-1612 1690-1670	1675-1655 1696-1680	1651-1640

Adaptado: (Kong & Yu, 2007b)

2.1.15 Caracterización morfológica por microscopía electrónica de barrido SEM

La caracterización morfológica se realiza con un microscopio electrónico de barrido (SEM) JEOL JSM-6490LV (JEOL Ltda. Tokio, Japón) ubicado en la Universidad de los Andes en Bogotá, a un voltaje de 10 kV, para las muestras liofilizadas y con recubrimiento de oro. Para identificar la microestructura de las micelas de caseína, se observa la superficie de las partículas con y sin tratamiento de alta presión. Las piezas secas se montaron en trozos de aluminio utilizando cinta adhesiva de 2 caras y se recubrieron con una capa delgada (20–30 nm de espesor) de oro-paladio en una máquina de recubrimiento por pulverización catódica en medio de argón.

Finalmente, después de la preparación de la muestra, para el examen de microestructura del queso se utilizó SEM convencional, a una tensión de aceleración de aproximadamente 5–15 kV y una ampliación de 500–10,000X

2.1.16 Desarrollo de producto fermentado

2.1.17 Cinética de Fermentación

Se exploró la función tipo Weibull, para conseguir una descripción adecuada de procesos de fermentación con lactosa como sustrato, y su conversión en ácido láctico, asumiendo que la producción de este ácido está asociada con el crecimiento microbiano.

Los datos de acidez se ajustan al modelo empírico de Weibull

Ecuación 1.1.1-1

$$\frac{Y(t) - Ye}{Yo - Ye} = exp^{-\left(\frac{t}{\alpha}\right)^{\beta}}$$

Donde Y(t) corresponde a la concentración de ácido láctico (g/L) en el t (min), Y_o es la concentración inicial de ácido láctico (g/L), Ye es la concentración de ácido láctico (g/L) en el equilibrio, β es el parámetro de forma (adimensional) y tiene relación inversa con la velocidad inicial de fermentación; α es el parámetro de velocidad en minutos, este representa el tiempo necesario para completar una concentración de ácido láctico en el equilibrio Ye durante 4 horas de fermentación (Kaur & Rao, 2017)

2.1.18 Comportamiento reológico

Se llevaron a cabo pruebas reológicas mediante la medición del esfuerzo cortante en función del tiempo a una velocidad de deformación constante de 100 s^{-1} (100 RPM) y 25°C, colectando 151 puntos. Para lo cual se emplea un viscosímetro digital de cono y placa de Brookfield® (Modelo DV-II+ PRO para viscosidades medias). Estas curvas son ajustadas por el modelo de Weltmann que describe el comportamiento reológico en función del tiempo.

Ecuación 1.1.1-1

$$\tau = A - B * \ln t$$

Donde τ indica el esfuerzo cortante (N/m^2) en el tiempo, A se asocia con el índice de fluencia (N/m^2), y B sobre la velocidad de los daños estructurales ($(N*S)/ m^2$) cuando el fluido se somete a una velocidad de cizallamiento (Rojas-Castro, Chacon-Villalobos, & Pineda-Castro, 2007)

2.1.19 Formulación de mezclas

Para definición de las formulaciones de uso la metodología de diseño de mezclas que consiste en un conjunto de experimentos en los que se prueban combinaciones particulares de los ingredientes. La suma de todos los componentes que integran la mezcla debe ser 100%, esto significa que los componentes no pueden ser manipulados independientemente unos de otros, y que sus proporciones deben variar entre 0 y 1 (Puente, E, Romero, Rodríguez, & Trejo, 2005).

Los límites de las mezclas se definieron con base en experimentos previos y se orientaron a encontrar un modelo de optimización de la aceptación sensorial de un panel de consumidores.

2.1.20 Determinación de la vida útil

2.1.20.1 Cinética de degradación

Para la determinación de la vida útil se emplea una metodología de abuso, que supone que los atributos físicos y sensoriales se comportan como lo hacen las reacciones químicas, es decir de acuerdo al modelo de la Ecuación y que puede ser determinado un orden de reacción *n* y una constante cinética *k,* mediante la regresión de estas ecuaciones y la evaluación del coeficiente de determinación R^2; para reacciones de orden cero, primer y segundo orden

Ecuación 1.1.1-1

$$\frac{dQ}{dt} = kQ^n$$

Donde Q es la variable medible que expresa el atributo de calidad, t es el tiempo y n es un valor mayor o igual a 0 que representa el orden de reacción.

Ecuación 1.1.1-2

$$Q = Qi + kt \qquad \text{Orden cero}$$

Ecuación 1.1.1-3

$$LnQ = LnQi - kt \qquad \text{Primer orden}$$

Ecuación 1.1.1-4 $\frac{1}{Q} = \frac{1}{Qi} + kt$ Segundo orden

El efecto de la temperatura en la cinética de reacción se evalúa con las constantes de velocidad de reacción de orden global, usando una ecuación tipo Arrhenius, la que permite determinar la energía de activación de las propiedades fisicoquímicas y del atributo aceptabilidad sensorial.

Ecuación 1.1.1-5 Arrhenius

$$k = Ae^{-Ea/RT}$$

Dónde: Ea: Energía de activación; R: Constante universal de los gases; T: temperatura en Kelvin. Para la linealización se aplica un proceso de regresión (Montogomery, 2004)

Bajo esta metodología se almacenan las muestras de producto tratado por HHP en la mejor condición definida por los ensayos previos y muestras control fabricadas con leche pasteurizada a 85°C por 30 min a tres condiciones de temperatura,4, 15 y 25 °C.

Se hace seguimiento de pH, acidez expresada como porcentaje de ácido láctico y aceptación sensorial expresada como el porcentaje de calificaciones de los panelistas superiores a 4 en una escala hedónica de 5 puntos, los días 5,15 y 30 de almacenamiento.

Una vez determinado el orden de reacción n y el valor de la constante cinética *k* se procede a calcular el tiempo por sustitución de los términos en la ecuación general.

2.1.20.2 Análisis sensorial para determinar la vida útil

Selección de los panelistas

La capacidad de discriminación se mide a través de la aplicación de pruebas triangulares que consisten en presentar a cada panelista tres muestras de las cuales dos son iguales y una diferente, el panelista debe identificar la muestra diferente siendo estas presentadas en orden aleatorio (Rosenthal, 1992).

Para la selección del panelista se registran los resultados de acierto de 10 pruebas triangulares y se considera la prueba Chi-cuadrada ($\chi 2$) ajustada.

Entrenamiento de los Panelistas

Para desarrollar una terminología descriptiva y entrenar a los panelistas, se llevaron a cabo pruebas sensoriales descriptivas sobre productos preparados bajo la formulación definida y procesados bajo las condiciones del estudio, esto con el propósito de familiarizar a los panelistas con los atributos sensoriales del producto fresco y formular en consenso la mejor escala descriptiva (ICONTEC, 1998).

El objetivo del entrenamiento es que los jueces sean capaces de detectar y reconocer sabores y olores, deben conocer los conceptos de clasificación con ayuda de una escala, clasificación en categorías, escalas de intervalos y escalas proporcionales y, por último, el uso de descriptores en que les permite desarrollar un vocabulario y así describir las características sensoriales (International Standard ISO 8586:2012).

Para obtener el dato de aceptación general los datos recogidos de las pruebas sensoriales se agrupan por frecuencias en cada uno de los valores de la escala: 5 Me gusta mucho; 4 Me gusta moderadamente; 3 Ni me gusta ni me disgusta;2 me disgusta moderadamente; 1 Me disgusta mucho, la expresión porcentual corresponde a la suma de las frecuencias en las calificaciones 4 y 5 dividido por el número total de pruebas.

Estos datos alimentan el estudio cinético de degradación y reciben el tratamiento ya descrito. Los promedios ponderados de la calificación de cada característica se alimentan a la matriz de evaluación para graficar el perfil.

2.1.21 Desarrollo de producto gelificado

2.1.22 Capacidad de retención de agua

La capacidad de retención de agua (CRA) es la habilidad de un producto mantener el agua ligada después de la aplicación de una fuerza moderada.

La medición de la CRA puede ser expresada como el agua retenida después de someter el gel a una fuerza suave como por ejemplo la centrifugación a baja velocidad. Para esto se cortó un disco de gel de aproximadamente 2 mm de alto y 2 cm de diámetro en dos porciones, que se fueron colocadas sobre una maya de nylon en el interior de un tubo de centrífuga de 50 ml. La pérdida de agua se determina pesando la muestra antes y después de centrifugarla a 120x*g* durante 5 min. La CRA se expresa como el porcentaje del agua inicial remanente en el gel luego de la centrifugación. Los valores son el promedio de al menos dos determinaciones.

2.1.23 Medición de las propiedades reológicas

Para establecer el comportamiento viscoelástico, se llevó a cabo una prueba oscilatoria, en la cual las muestras se sometieron a pequeñas deformaciones de amplitud sinusoidal. A partir de experimentos oscilatorios, el módulo complejo ($G^* (i\omega)$) se puede expresar como función del módulo de almacenamiento ($G'(\omega)$) y módulo de pérdida ($G'' (\omega)$). La tangente ($\tan \delta$) es la relación entre la energía perdida y la energía almacenada por ciclo de deformación (Gunasekaran & Ak, 2000).

Ecuación 1.1.1-1 $$G* = [G'^2 + G''^2\ ]^{1/2}$$

Ecuación 1.1.1-2 $$\mathrm{Tan}\,\delta = \frac{G''}{G'}$$

Como función alternativa al módulo complejo, se define la viscosidad compleja, η* como:

Ecuación 1.1.1-3 $$\eta^* = G^* / \omega$$

Que es una medida de la magnitud de la resistencia total de la muestra al esfuerzo de corte dinámico. Por simplicidad los resultados experimentales de las medidas dinámicas se expresan en términos de G', G'', Tan δ y η* como función de la frecuencia angular a una temperatura constante.

Los ensayos se llevaron a cabo en un reómetro (Paar - Physica MCR 301, Anton Paar GmbH, Ostfildern, Alemania) utilizando un sensor de platos paralelos con una separación de 1 mm entre ambos platos. El equipo se programa de manera tal que en todos los casos las medidas las realizan por triplicado. Las muestras, se colocan (1 ml) sobre el plato inferior termostático a 35ºC durante 45 minutos para permitir acondicionamiento, para prevenir la deshidratación de la muestra se adiciona silicona de baja viscosidad alrededor del borde de los platos.

El rango de visco elasticidad lineal se determina, midiendo G* en función de la deformación (barrido de deformación). Con base a estos resultados, los barridos de frecuencia (ω= 1 rad/s) de las muestras se realizan a la misma deformación (*d* = 10%), dentro de los límites de la linealidad.

Los datos experimentales se ajustan a la siguiente ecuación (Steffe, 1996b)

Ecuación 1.1.1-4 $$G' = a\omega^{\,b}$$

Donde *a* y *b* son parámetros que caracterizan el comportamiento reológico, y son obtenidos por un método de ajuste no lineal.

Para la caracterización visco elástica de las muestras se realiza, luego de la gelificación, mediante un barrido de frecuencias donde se analiza la variación de G', G'' y η* en función de la frecuencia de oscilación angular, y se comparan los resultados con los modelos anteriormente descriptos. En todos los casos G' y G'' están expresados en Pascales (Pa) y la η* en Pascales segundo (Pas).

2.1.24 Microscopía CRIO-SEM

Las técnicas de observación visual son un elemento complementario de análisis importante en el estudio de la estructura de los geles proteicos (El-Bakry & Sheehan,

2014). Se usó una metodología de Crio-SEM, donde se adapta una cámara de baja temperatura lo que facilita el examen microscópico de productos lácteos ricos en agua, aire o grasa con una distorsión mínima (Kalab, 1980).

Esta técnica Crio-SEM utiliza temperaturas por debajo de -80°C durante todo el protocolo de examen de la muestra. Las muestras se ubicaron en el disco porta muestras en estado fresco sin preparación previa y se congelaron directamente en el Microscopio JEOL JSM-6490LV. Las observaciones se realizaron a 10 kV, en aumentos de X300, X1000 y X3000 (El-Bakry & Sheehan, 2014).

2.1.25 Análisis sensorial

Los ensayos afectivos son utilizados para evaluar opinión, preferencia y/o aceptación del producto. Se usan panelistas no entrenados, seleccionados al azar y representativos de la franja de población a la cual el producto está dirigido. Se necesita un número mínimo de 24 panelistas (ICONTEC, 2013).

Se realizó una evaluación sensorial de los geles producidos bajo las condiciones del experimento para indagar sobre los atributos sensoriales. Se realizó un ensayo afectivo sobre un grupo de 41 panelistas seleccionados al azar, con edad entre los 19 y 25 años, con el objetivo de evaluar las opiniones y/o la aceptación del producto.

La prueba consistía en responder a una escala hedónica de 5 puntos, acerca de 5 aspectos del producto, Olor, Color, Sabor; Textura y Aceptación general, evaluados en ese orden sobre muestras codificadas, entregadas en cada sesión. Los datos se agrupan por frecuencias en cada uno de los valores de la escala: 5 Me gusta mucho; 4 Me gusta moderadamente; 3 Ni me gusta ni me disgusta;2 me disgusta moderadamente; 1 Me disgusta mucho. El resultado de apreciación sensorial se calificó como el promedio acumulado de las calificaciones numéricas.

2.1.26 Evaluación nutricional

Se calcularon los porcentajes de proteínas, lípidos, hidratos de carbono, agua y kilocalorías que aportan los geles mejor calificados en los parámetros fisicoquímicos y sensoriales, se hicieron las comparaciones respectivas con los valores de la dosis diaria recomendada para adultos en una dieta de 2000 Kcal.

El valor energético se calculó utilizando los coeficientes energéticos con los valores propuestos por Atwater de 9 kcal (37,7 kJ) para la grasa, 4 kcal (16,7 kJ) para los carbohidratos y 4 kcal (16,7 kJ) para las proteínas, que se basan en la cantidad de energía que se libera cuando estos macronutrientes se oxidan metabólicamente,

considerando una absorción intestinal incompleta (Pintor, Hernández, Ricaurte, Alonso, & Cubides, 2016).

2.1.27 Estudio Microbiológico

El recuento microbiano se llevó a cabo con homogenización de 10 gramos de muestra con 90 ml de agua peptonada al 0,1% en un stomacher durante 30 segundos. Luego se realizan diluciones seriadas en agua peptonada al 0,1% y se agregan las diluciones apropiadas en agar para recuento en placa (PCA) para el conteo microbiano total (48 horas 37ºC) y en agar levadura glucosa cloranfenicol (YGC) para recuento de hongos y levaduras (5 días, 30ºC), todas las muestras por triplicado.

2.1.28 Análisis estadístico

Para determinar los efectos respectivos de las variables según los distintos diseños experimentales se realizó en la mayoría de los casos un análisis de varianza unidireccional (ANOVA), y para determinar la variabilidad interna de los datos experimentales, un análisis de varianza-covarianza.

En los diseños de superficie de respuesta se determinaron y resolvieron simultáneamente ecuaciones multivariadas de la forma:

Ecuación 1.1.1-1

$$yi = \gamma 0 + \gamma 1x1 + \gamma 2x2 + \gamma 3x1x2 + \gamma 4x1^2 + \gamma 5x2^2$$

Donde y_i es la variable de respuesta, γ_0 es el intercepto, γ_1, γ_2 son los coeficientes lineales, γ_3 es el factor que representa la interacción entre las variables, y γ_4, γ_5 son los coeficientes cuadráticos (Montogomery, 2004). Los resultados se representaron en graficas de superficie para la observación de los efectos.

Para la selección de panelista se usa una función de probabilidad para representar los datos y predecir propiedades de la población, se aplicó una prueba de Chi cuadrado (x^2) para verificar la validez de la función asumida.

Este método permite comparar frecuencias observadas contra frecuencias esperadas hipotéticamente. El estadístico chi-cuadrado se estima a partir de la Ecuación 2.6-8:

Ecuación 2.6-8

$$X2 = \left[\frac{(|O1 - E1|)\text{^}2 - 0{,}5}{E1}\right] + \left[\frac{(|O2 - E2|)\text{^}2 - 0{,}5}{E2}\right]$$

Donde $O1$ corresponde al número de respuestas correctas observadas, $O2$ corresponde al número de respuestas incorrectas observadas, $E1$ es el número de respuestas correctas esperado, igual al número de evaluaciones multiplicado por la probabilidad de tener una respuesta correcta ($p = 0.333$ para triangular.) y $E2$ es el número de incorrectas esperado, igual al número de evaluaciones multiplicado por la probabilidad de obtener una respuesta incorrecta por azar ($q = 0.667$ para triangular).

La generación de los parámetros de los modelos aplicados, se realizó por correlación lineal y no lineal según el caso, y se aplicó un análisis de regresión para determinar un coeficiente de correlación (R^2). Todos los datos se procesaron usando el software Desing expert® versión 8.1.

CAPÍTULO 3-Tratamientos de Alta presión y de Ultrasonido

Equipo Ultrasonido

3 Efecto del tratamiento con HHP y Ultrasonido en la coagulación de las proteínas de leche – Producción de queso y suero

3.1.1 Introducción

Se evaluó el efecto de la aplicación de alta presión hidrostática y de ultrasonido de baja frecuencia como pretratamiento de la leche sobre el rendimiento de coagulación y las características fisicoquímicas en la producción de queso fresco.

Para los tratamientos con alta presión, se propuso un diseño experimental factorial, controlando las variables de presión (200, 400 y 600 MPa) y tiempo (15 y 30 minutos), mientras que para los tratamientos por ultrasonido se propuso un diseño experimental Central Compuesto (CCD) controlando las variables de potencia del equipo (173 a 218W) y tiempo de sonicación (1 a 10 minutos).

Los cambios a nivel molecular, en la leche sometida a los tratamientos, fueron controlados por la medición en los cambios en la distribución de tamaño de partícula (z-Sizer), los cambios en la hidrofobicidad superficial por fluorescencia, usando 1–anilino naftaleno–8–sulfonato (ANS) y 6-propionil-2- (N,N-dimetil amino) naftaleno (PRODAM) como sondas de fluorescencia. Los resultados de estos análisis en la leche serán discutidos en conjunto con los resultados del suero, después de los resultados de las caseínas (cuajada-queso).

El efecto de los tratamientos sobre las propiedades de coagulación fue medido a través del rendimiento quesero, la humedad, el contenido de proteína en el suero, las propiedades texturales y la sinéresis de los quesos, para los quesos producidos a partir de leche sonicada, fue controlado también el cambio de color.

En los quesos fueron verificadas las interacciones proteína-agua por medición de las isotermas de sorción para calcular la mono capa (Mo) y el calor isostérico (q_{st}) que resulta indicativo de la energía necesaria para vencer las fuerzas moleculares entre el agua y la superficie de la proteína en la desorción y da cuenta de las modificaciones superficiales. Para evaluar os cambios a nivel de la estructura de las proteínas, se aplicó espectroscopia de Infrarrojo Medio de Transformada de Fourier (FTMIR) todas las muestras de leche, queso y suero de alta presión y a los sueros de la leche sometida al ultrasonido.

Los resultados individuales de cada una de las tecnologías aplicadas se describen a continuación.

3.1.2 Efecto del tratamiento con Alta Presión

Para establecer el efecto de las condiciones de operación sobre la coagulación y la textura en la producción de queso fresco, se utilizó un diseño factorial completo, la tabla 3.2-1 se pueden ver los ensayos propuestos, los cuales se realizaron por triplicado de manera aleatoria.

Tabla 3.2-1 Diseño experimental factorial para la ejecución de los experimentos

Variables codificadas		Variables naturales		Codigos muestras
X1	X2	P(MPa)	t (min)	
1	1	200	15	200-15
1	2	200	30	200-30
2	1	400	15	400-15
2	2	400	30	400-30
3	1	600	16	600-15
3	2	600	30	600-30
		Blanco		

La Leche tratada por alta presión fue almacenada a 4°C hasta la coagulación, previo a la cual se adiciono con 250 pm de cloruro de calcio y se acondiciono para el proceso de coagulación con cuajo de origen microbiano (0,1%) en el sistema de coagulación termostático descrito en la metodología.

3.1.3 Efecto de HHP sobre el rendimiento quesero

Con la implementación del sistema de coagulación y corte, teniendo siempre el mismo tamaño de grano, se estima que los cambios reportados tanto en el rendimiento como en la humedad responden al tratamiento de HHP. La Figura 3-1 muestra el tamaño de corte y el fenómeno de sinéresis previo a la separación del suero.

Figura 3-1 Cuajada cortada y sinéresis

En la Tabla 3.2-2 se puede ver el efecto del tratamiento por alta presión aplicado a leche que previamente tuvo un tratamiento térmico a baja temperatura (LTST 70°C-20s), el tratamiento a 200 MPa durante 15 minutos aumenta el rendimiento quesero, pero no presenta una diferencia estadísticamente significativa en relación con el blanco, al aumentar el tiempo de tratamiento a 30 minutos el rendimiento aumenta un 6,4% con relación al obtenido por el blanco y esta diferencia es estadísticamente significativa (p = 0,005).

Tabla 3.2-2 Comparativo del rendimiento quesero a las condiciones de tratamiento HHP

Condición	*Rendimiento*	*Relación con el Blanco*
200-15	9,82±0,2^{a}	104,2%
200-30	10,03±0,2^{b}	106,4%
400-15	10,94±0,6^{b}	116,0%
400-30	11,61±0,6^{b}	123,1%
600-15	12,06±0,1^{c}	127,9%
600-30	12,33±0,2^{d}	130,8%
Blanco	9,43±0,2^{a}	100,0%

Valores marcados con letras diferentes en una misma columna indican que tienen una diferencia estadísticamente significativa $(p < 0{,}05)$

Para los tratamientos entre 400 y 600 MPa a los tiempos ensayados hay un aumento en la cantidad de cuajada producida y por lo tanto el rendimiento aumenta progresivamente, todos los valores obtenidos tienen diferencias estadísticamente significativas entre ellos y con el blanco $(p = 0{,}03)$.

Los resultados muestran que el tratamiento de alta presión aplicado sobre leche que ya ha sufrido un tratamiento térmico previo, produce un efecto complementario a los valores obtenidos sobre leche cruda reportados en otros estudios, (Huppertz et al., 2004a) llegando a un aumento del 31% del rendimiento para un tratamiento de 600 MPa por 30 min, respecto a la leche sin tratamiento de alta presión. Algunos estudios muestran que hay un efecto sinérgico entre la temperatura y la presión sobre la desnaturalización de la β-Lg reflejado en el mayor rendimiento quesero (López-Fandiño *et al.*,1996), para este caso las muestras tienen un tratamiento previo a baja temperatura, al que se suma el tratamiento de alta presión. El aumento en el rendimiento quesero pude atribuirse a dos efectos particularmente, por un lado, a presiones superiores a 400 MPa el 80% de la β-LG y el 55% de las proteínas totales del suero son

desnaturalizadas y pueden asociarse a las micelas de caseína, y por el otro a un aumento en la retención de suero por parte del coagulo (Huppertz et al., 2004b, 2004c).

Otros investigadores han reportado que el rendimiento de la cuajada de la leche cruda tratada a entre 100 y 250 MPa durante 30 minutos a 20 °C difirió solo ligeramente del de la leche no tratada; sin embargo, el tratamiento a 400, 600 y 800 MPa durante 30 min aumentó significativamente el rendimiento de la cuajada en un 10, 24 o 25%, respectivamente, valores ligeramente más bajos que los obtenidos en este estudio (Zobrist et al., 2005).

El contenido de humedad de la cuajada de leche tratada a 200 MPa es igual a la leche no tratada, mientras que el contenido de humedad de cuajada de leche tratada a 400 y 600 MPa es mayor hasta en un 20% que el de la leche sin tratar. En la Tabla 3.2-3 se pueden ver resumidos estos resultados, bajo todas las condiciones probadas, existiendo una diferencia estadísticamente significativa $(p < 0{,}05)$ en el contenido de humedad de la cuajada producida sin tratamiento HHP.

Los efectos de HHP en el contenido de humedad de la cuajada pueden deberse a varios mecanismos, como por ejemplo los cambios inducidos por HHP en la cantidad de agua unida por las micelas de caseína, es decir, la hidratación de a micela (Anema et al., 2005; Regnault et al., 2004; Zobrist et al., 2005). Otro efecto asociado puede ser las interacciones de β-Lg desnaturalizada con micelas de caseína, lo que aumenta la carga negativa neta sobre las micelas, mejorando así la hidratación de la proteína (López-Fandiño, 2006; Royer, 2002). Otros cambios inducidos por HHP en micelas de caseína, tales como la reducción en el tamaño y la formación de partículas de forma irregular, también es probable que aumenten la hidratación de la micela (Anema et al., 2005).

Durante el proceso de coagulación, las moléculas de *k*-caseína que proporcionan una capa estabilizante estérica con sus péptidos C-terminales hidrófilos que sobresalen en la fase acuosa, sufre una proteólisis que se acompaña de la liberación de un péptido hidrófilo, denominado caseinomacropéptido (CMP), en la fase de suero. La pérdida gradual del CMP se acompaña de una disminución en la potencial zeta de la micela que da como resultado la desestabilización de las micelas y la agregación en un gel (Anema et al., 2005; Considine et al., 2007).

Tabla 3.2-3 Contenido de humedad de la cuajada de leche bajo distintas condiciones de P (MPa) y T (min)

Condición	*Humedad cuajada %*	*Relación con el Blanco*
200-15	50,86±0,1[a]	100,0%
200-30	51,26±0,2[b]	100,8%
400-15	53,52±0,6[c]	105,2%
400-30	54,28±0,3[d]	106,7%
600-15	55,64±0,1[e]	109,4%
600-30	61,36±0,2[e]	120,7%
Blanco	50,80±0,2[a]	100,0%

Valores marcados con letras diferentes en una misma columna indican que tienen una diferencia estadísticamente significativa $(p < 0{,}05)$

La pérdida de CMP en el suero se refleja en el contenido de proteína en el suero, pero, por otra parte, las proteínas desnaturalizadas del suero pasan a hacer parte de las proteínas en la cuajada, por lo tanto, el contenido de nitrógeno tanto en la cuajada como en el suero reflejan en promedio estos dos fenómenos.

La interacción entre proteínas de suero desnaturalizadas y micelas de caseína conducen a su incorporación en la cuajada, reduciendo así el nivel de proteína en el suero y aumentando la concentración de nitrógeno en la cuajada, esto se puede ver en la Figura 3-2 (Huppertz et al., 2004b; Rasmussen et al., 1999; Regnault et al., 2004).

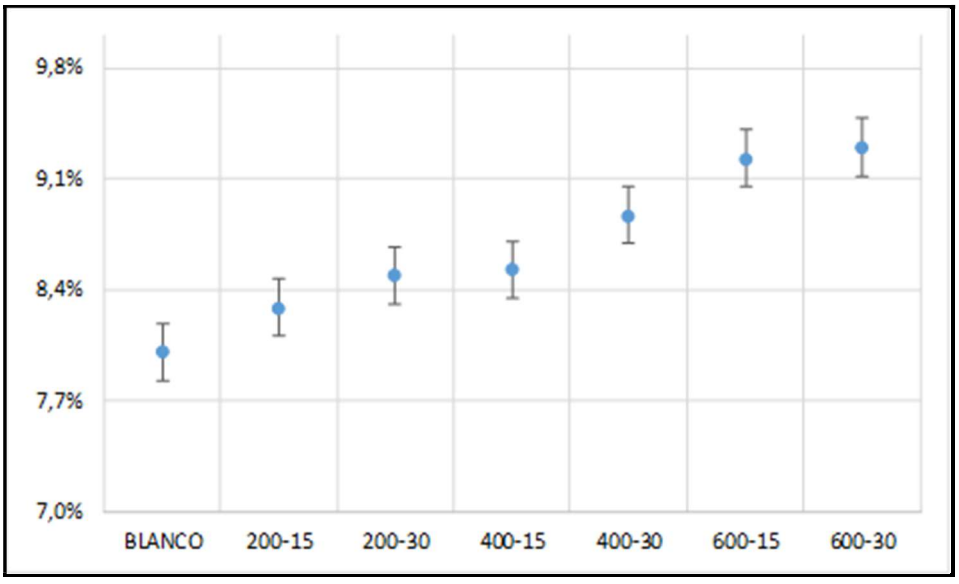


Figura 3-2 Contenido de nitrógeno en la cuajada a las condiciones de tratamiento

El contenido de nitrógeno del suero de la leche tratada con HHP disminuye progresivamente con el aumento de la presión de tratamiento a partir de 400 MPa, hasta en un 19% en suero de leche tratada a 600 MPa - 30 min. Estos resultados tienen también relación con el aumento en el rendimiento y la humedad de la cuajada.

El aumento del tiempo de tratamiento de 15 a 30 minutos a una misma presión también incrementa el rendimiento de cuajada y reduce el contenido de proteína de suero entre un 5 y 7% adicional. Los resultados de la Tabla 3.2-4 muestran el contenido Nitrógeno en el suero, todos muestran una diferencia estadísticamente significativa con el blanco y entre ellos $(p < 0{,}005)$.

Los resultados de este estudio muestran que el tratamiento HHP de la leche aumenta el rendimiento de la cuajada, afecta el contenido de humedad de la cuajada y reduce el contenido de proteína del suero de leche. Los aumentos en el rendimiento de la cuajada después del tratamiento a una presión 400 MPa está de acuerdo con lo reportado por otros estudios (Huppertz et al., 2004a; López-Fandiño, 2006; Zobrist et al., 2005).

Tabla 3.2-4 Contenido de nitrógeno en el suero bajo condiciones de HPP (200-600 MPa y 15-30 min)

Suero	*% N*	*Relación con el Blanco*
200-15	1,83±0,028[a]	106,8%
200-30	1,84±0,02[b]	107,4%
400-15	1,60±0,02[c]	93,5%
400-30	1,50±0,02[d]	87,7%
600-15	1,47±0,02[e]	86,2%
600-30	1,40±0,02[f]	81,6%
Blanco	1,71±0,02[g]	100,0%

Valores marcados con letras diferentes en una misma columna indican que tienen una diferencia estadísticamente significativa $(p < 0{,}05)$

El tiempo de tratamiento a 400 y 600 MPa tiene una influencia considerable en la magnitud de los efectos de HHP sobre el rendimiento de la cuajada (Tabla 3.2-4). Los aumentos inducidos por HHP en el rendimiento de la cuajada son debidos a la incorporación de proteínas de suero desnaturalizadas en la cuajada. La desnaturalización inducida por HHP de α-La o β-Lg a una presión 400 a 600 MPa, fue reportada en los resultados de estudios previos (Anema, 2012; Centre et al., 2005; Farrag & Shendy, 2010; Hinrichs & Rademacher, 2004; Indyka et al., 2008).

El efecto de formación de enlaces disulfuro entre la β-Lg y κ- caseína fue probado por otros investigadores, mediante la adición de un agente bloqueante de sulfhídrilo, N-etilmaleimida (NEM), a la leche antes del tratamiento con HHP y efectivamente el contenido de proteína del suero no se vio afectado (Livney & Dalgleish, 2004).

El tratamiento de la leche por HHP aumenta considerablemente los niveles de caseínas no asociadas en micelas, posiblemente aumentando así el nivel de caseínas en el suero. Sin embargo, el tratamiento a las presiones estudiadas (400-600 MPa) reduce el contenido de proteína del suero, indicando que la influencia de la interacción de la proteína de suero desnaturalizada con micelas de caseína sobre el contenido de proteína en el suero es mucho mayor que la contribución de la disociación de caseína.

3.1.4 Efecto de HHP sobre la textura

Las propiedades texturales del queso se ven afectadas por su composición fisicoquímica, siendo importantes el contenido de grasa, de proteínas y de humedad, aunque también influyen la tecnología de procesamiento y la intensidad de la proteólisis. La red proteica de los quesos está formada por las α_{S1} y κ caseínas, cuyas cadenas helicoidales forman celdas que encierran los glóbulos de grasa, lo que indica que la relación de grasa proteína en la leche es crítica, así como el contenido de minerales, un incremento en materia grasa y contenido de agua debilitan la estructura proteica, mientras que una disminución de los mismos provoca un endurecimiento (Carrascosa & Olano, 1996; Gutierrez-Mendez et al., 2013; Huppertz et al., 2004a).

La disminución de la dureza responde a una menor perdida de suero durante la sinéresis que resulta en un mayor contenido de humedad de la cuajada, además, este parámetro depende de la constitución de la muestra, del tamaño de las micelas de caseína y de α_{S1} caseína (Gutierrez-Mendez et al., 2013; Huppertz et al., 2004a).

La agregación de las proteínas séricas ocasiona también un aumento en la carga negativa de la micela, lo que genera repulsión entre los agregados proteicos, generando un queso con mayor humedad, más elástico y menos compacto (Huppertz et al., 2004b, 2004a).

La Figura 3.3 muestra los distintos perfiles de textura producidos por el tratamiento comparados con el perfil del blanco. El tratamiento con HHP de leche entre 200 y 400 MPa durante 15-30 min disminuyó la dureza del producto prensado, posiblemente debido a un aumento en la superficie de caseína disponible para interacción con las proteínas del suero y a una mayor retención de agua en la matriz debida a disrupción de micelas de caseína a estas presiones.

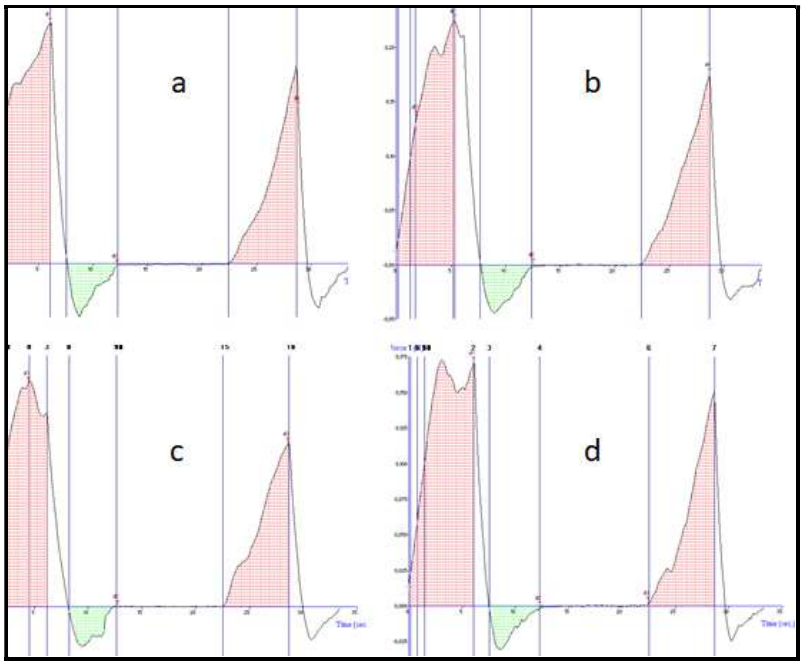


Figura 3-3 Perfil de textura (a) Blanco; (b) 200 MPa-30 min; (c) 400 MPa-30 min; (d) 600 MPa-30 min

Las propiedades texturales están marcadas por las interacciones de las micelas de caseína, por lo tanto, los cambios inducidos por la presión especialmente sobre la α_{s1}-caseína, dan como resultado una disminución de la dureza y en consecuencia de las demás propiedades texturales como la elasticidad (Anema et al., 2005; Huppertz et al., 2004b; Rasmussen et al., 1999).

La disminución de la dureza tal como se ve en la Tabla 3.2-5, responde también a una menor pérdida de suero durante la sinéresis, lo que resulta en un mayor contenido de humedad de la cuajada. La Figura 3.4 muestra la fuerte disminución de la dureza conforme se va aumentando la presión del tratamiento, la textura del material tratado a 600 MPa se puede desmoronar fácilmente y presenta muchas dificultades para el moldeado.

Tabla 3.2-5 Parámetros de textura a las condiciones del estudio

Condición	*Dureza(N)*	*Elasticidad*	*Cohesividad*	*Masticabilidad*	*Adhesividad*	*Gomosidad*
Blanco	18,73±2,2 a	1,04±0,17 a	0,49±0,05 a	10,36±0,33 a	-0,43±0,06 a	10,00±1,0 a
200-15	16,81±2,5 a	4,54±0,75 b	0,62±0,02 b	3,46±0,28 b	-0,26±0,04 b	19,66±2,1 b
200-30	11,76±2,3 b	8,05±0,76 c	0,28±0,02 c	2,69±0,79 b	-0,19±0,03 c	18,66±1,5 b
400-15	9,27±0,96 c	5,61±0,58 d	0,51±0,02 a	2,51±0,69 b	-0,18±0,01 c	18,62±1,2 b
400-30	7,59±0,59 d	6,08±0,50 d	0,26±0,04 c	2,26±0,21 c	-0,20±0,01 c	20,00±1,0 b
600-15	6,60±0,58 e	8,70±0,50 c	0,41±0,01 d	0,98±0,03 d	-0,26±0,02 d	10,14±1,1 a
600-30	4,50±0,48 f	6,80±0,76 e	0,23±0,01 c	0,72±0,14 e	-0,27±0,02 d	9,06±1,2 a

Valores marcados con letras diferentes en una misma columna indican que tienen una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0{,}05$)

Por otro lado, el aumento en la hidratación de las proteínas ocasiona una menor interacción entre ellas provocando la disminución de la firmeza de la matriz proteica (Gutierrez-Mendez et al., 2013).

Las caseínas forman una estructura heterogénea en quesos obtenidos a partir de coagulación enzimática, donde la matriz proteica está constituida básicamente de fosfoparacaseínato de calcio. Durante la coagulación, las moléculas de paracaseína se unen mediante atracciones electrostáticas y de Van der Waals, dando lugar a filamentos irregulares que se entrecruzan, manteniendo la integridad de la matriz (Huppertz et al., 2004a; Zobrist et al., 2005).

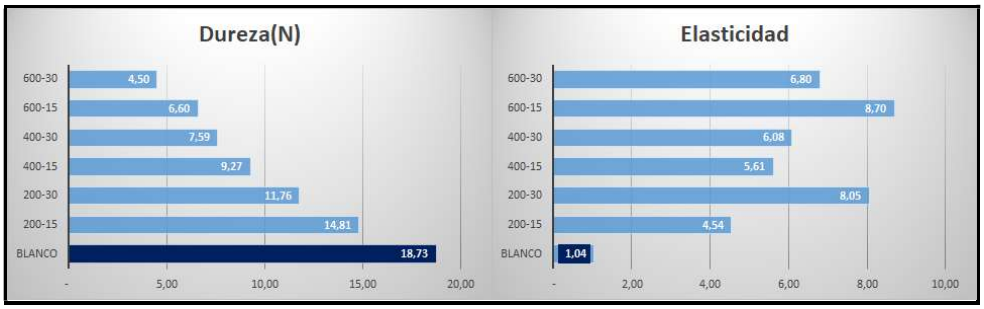


Figura 3-4 Comportamiento de la dureza y la elasticidad con el tratamiento HPP

El número de filamentos formados determina la capacidad de soportar un esfuerzo, por lo tanto, hay una correlación positiva entre el volumen de la fracción proteica y la firmeza del queso. A mayor número de filamentos, existirá un aumento de enlaces intra e inter-filamentos, formando una matriz más elástica y por tanto más difícil de deformar (El-Bakry & Sheehan, 2014). Tal como se ve en las Figuras 3-5 y 3-6, en quesos producidos a partir de leche tratada por HHP se observa una disminución de las interacciones de las proteínas, asociado a un menor entrecruzamiento de filamentos, ocasionando una disminución de la dureza y aumento de la elasticidad, así como una disminución en la adhesividad y masticabilidad.

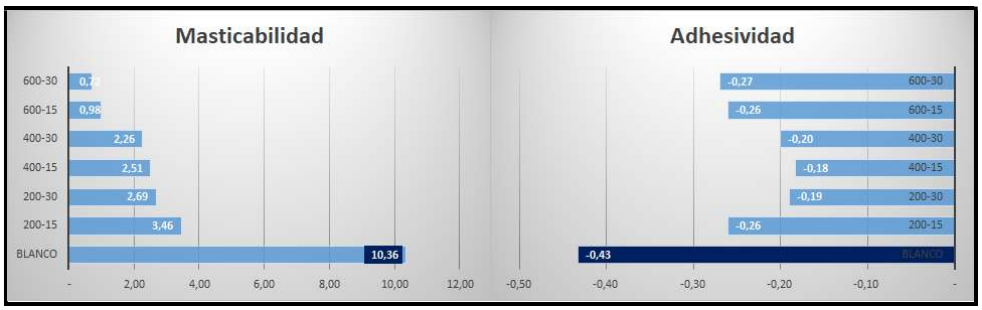


Figura 3-5 Comportamiento de la masticabilidad y la adhesividad

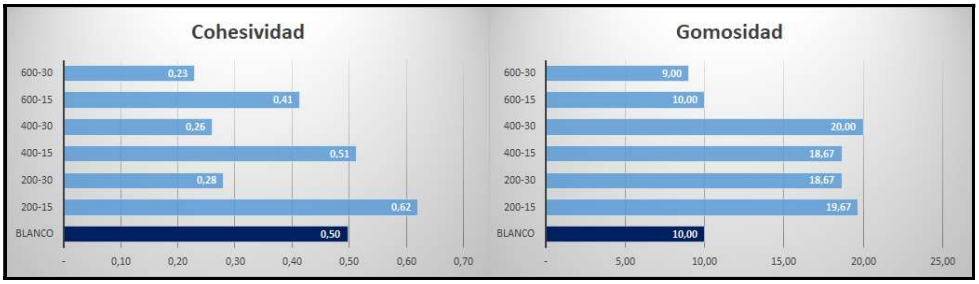


Figura 3-6 Comportamiento de la cohesividad y la gomosidad

3.1.5 Efecto del HHP sobre las isotermas de adsorción

Los datos experimentales del contenido de humedad determinados gravimétricamente para cada una de las condiciones de actividad de agua y temperatura, se graficaron para establecer el comportamiento de las isotermas de adsorción, tal como se ve en la Figura 3-7, en las gráficas se observa un crecimiento lento hasta actividades de agua de 0,6 - 0,7 y a partir de esa zona un marcado crecimiento de la pendiente, este comportamiento correspondería a la etapa de agua ligada como mono capa y a la formación de multicapas (Gil et al., 2013a).

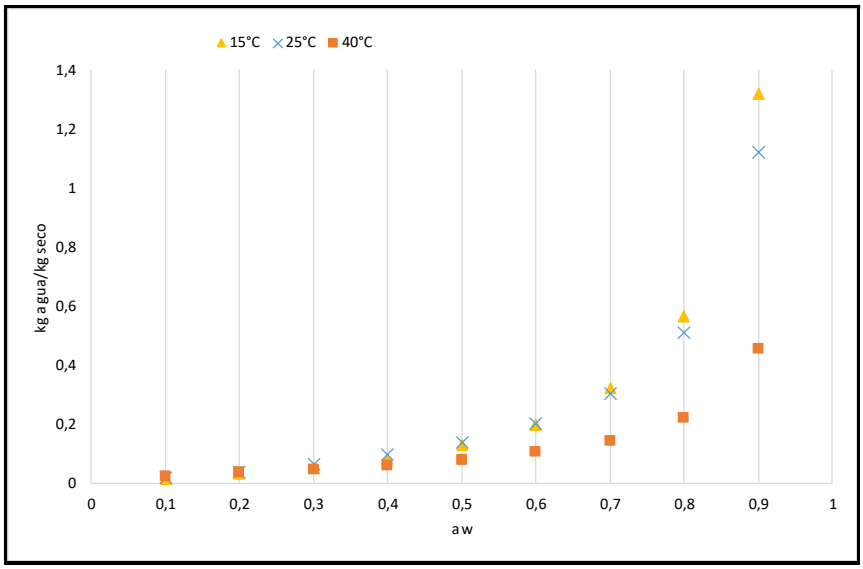


Figura 3-7 Datos experimentales de contenido de agua *contra* actividad de agua a tres temperaturas

En actividades de agua superiores a 0,6 hay un aumento rápido de la pendiente debido a que el agua esta como agua libre. Las formas de las curvas son comparables a las observadas en otros trabajos en los cuales se estudiaron leche en polvo entera y leche en polvo descremada (Soteras et al., 2014).

Con el fin de establecer los parámetros del modelo de GAB (*Xm, C, K*) se usó la herramienta de Excel Solver® comparando los resultados experimentales con los valores calculados buscando la menor diferencia por iteraciones sucesivas.

Ecuación 1.1.1-1 Modelo de GAB

$$X = \frac{Xm.C.k.aw}{(1-k.aw).(1+(C-1)k.aw)}$$

Los valores de los parámetros del modelo se encuentran tabulados para cada una de las temperaturas ensayadas, además del ajuste del modelo (R^2) que en todos los casos fue superior al 0,96.

La constante de Guggenheim (C) del modelo de GAB, presentó dependencia de la temperatura y valores diferenciales con la presión de tratamiento, mientras que para la constante k se observó dependencia de la presión del tratamiento (Soteras et al., 2014).

Tabla 3.2-6 Parámetros del modelo de GAB a 15°C

	Blanco	*200-15*	*200-30*	*400-15*	*400-30*	*600-15*	*600-30*
				15°C			
Xm	0,129±0,008^{a}	0,134±0,004^{a}	0,135±0,001^{b}	0,139±0,001^{c}	0,143±0,009^{d}	0,148±0,002^{e}	0,151±0,009^{f}
C	0,732±0,002^{a}	0,732±0,001^{a}	0,732±0,001^{a}	0,731±0,009^{a}	0,731±0,007^{b}	0,731±0,006^{b}	0,731±0,005^{b}
k	0,741±0,007^{a}	0,740±0,004^{a}	0,739±0,002^{b}	0,737±0,009^{b}	0,736±0,006^{c}	0,735±0,003^{d}	0,734±0,001^{e}
R^2	0,973	0,976	0,968	0,998	0,987	0,976	0,967

Valores marcados con letras diferentes en una misma fila indican que tienen una diferencia estadísticamente significativa $(p < 0{,}05)$

En las Tablas 3.2-7 y 3.2-8 se muestra la tendencia a disminuir del contenido de humedad de la monocapa (Xm) al aumentar la temperatura, lo que puede deberse a la menor disponibilidad de los sitios activos en las proteínas para la unión con el agua.

Tabla 3.2-7 Parámetros del modelo de GAB a 25°C

	Blanco	*200-15*	*200-30*	*400-15*	*400-30*	*600-15*	*600-30*
				25°C			
Xm	0,103±0,009^{a}	0,106±0,008^{a}	0,108±0,001^{b}	0,111±0,003^{c}	0,115±0,002^{d}	0,118±0,006^{e}	0,121±0,006^{f}
C	1,300±0,009^{a}	1,300±0,008^{a}	1,300±0,005^{a}	1,300±0,004^{a}	1,300±0,001^{a}	1,299±0,009^{b}	1,299±0,007^{b}
k	0,803±0,006^{a}	0,802±0,002^{a}	0,800±0,008^{b}	0,799±0,004^{b}	0,798±0,001^{c}	0,796±0,006^{d}	0,795±0,002^{e}
R^2	0,970	0,962	0,965	0,957	0,987	0,987	0,966

Valores marcados con letras diferentes en una misma fila indican que tienen una diferencia estadísticamente significativa $(p < 0{,}05)$

De estos análisis de correlaciones, se puede ver que en las muestras tratadas por alta presión hay un incremento de masa por adsorción de agua, a pesar de que se produce a velocidades menores a bajos niveles de actividad de agua. Estos resultados pueden ser explicados, por el contenido de azúcares que se involucran en un proceso de disolución, esto corresponde con lo reportado por (Gil, Muratona, Yacanto, Soteras, & Abaca, 2013b), que señalan que en productos alimenticios ricos en azúcares no se presentan altas velocidades de adsorción de agua a bajos niveles de a_w, pero suelen presentar altas capacidades de adsorción (incremento de masa por adsorción de agua), sólo que lo hacen de manera más lenta.

Tabla 3.2-8 Parámetros del modelo de GAB a 40°C

	Blanco	*200-15*	*200-30*	*400-15*	*400-30*	*600-15*	*600-30*
				40°C			
Xm	0,039±0,006^{a}	0,040±0,007^{a}	0,041±0,002^{b}	0,043±0,009^{c}	0,043±0,009^{d}	0,045±0,002^{e}	0,046±0,004^{f}
C	5,752±0,003^{a}	5,751±0,006^{a}	5,750±0,006^{a}	5,748±0,008^{a}	5,748±0,008^{a}	5,747±0,009^{a}	5,746±0,009^{b}
k	0,976±0,002^{a}	0,974±0,005^{a}	0,972±0,008^{b}	0,969±0,004^{b}	0,969±0,004^{c}	0,967±0,007^{d}	0,966±0,001^{e}
R^2	0,982	0,978	0,962	0,957	0,957	0,962	0,965

Valores marcados con letras diferentes en una misma fila indican que tienen una diferencia estadísticamente significativa $(p < 0{,}05)$

El ajuste de los datos experimentales y los datos calculados con base en los parámetros del modelo se pueden ver en la Figura 3-8.

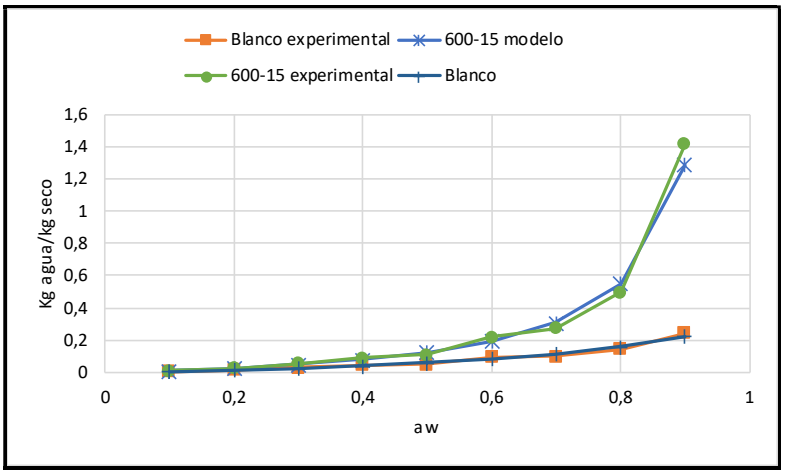


Figura 3-8 Ajuste de los datos experimentales y calculados por el modelo GAB a 15°C

Por otra parte, el contenido de humedad disminuye al aumentar la temperatura, para humedades inferiores a 0,5 g agua/g ms, a partir de esta humedad hay un entrecruzamiento de las curvas, mostrando menores contenidos de humedad para las

muestras a 40°C, esto es atribuible a la composición de la muestra, pues pueden darse fenómenos como la disolución de la lactosa, cuya solubilidad aumenta al aumentar la temperatura.

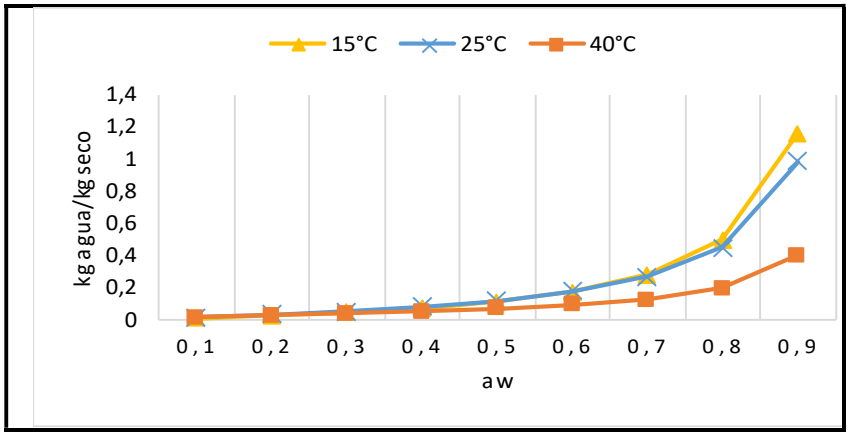


Figura 3-9 Efecto de la temperatura sobre las Isotermas de adsorción

El contenido de agua en la monocapa aumenta con el aumento de la presión y el tiempo del tratamiento, esto debido a que a presiones superiores a 200 MPa se produce la disociación de la β-Lg que está en forma de dímero, lo que conlleva un aumento de la capacidad de hidratación de la proteína. El agua penetra en su interior y produce cambios en su conformación estructural (Goyal et al., 2013).

El análisis de infrarrojo muestra también una disminución de la cantidad de lámina β y α hélice, indicando la desnaturalización de la proteína, que aumenta con el nivel de presión haciendo que se hidrate cada vez más, debido al rompimiento de los puentes de hidrógeno intramoleculares que forman interacciones intermoleculares entre el agua y los nuevos residuos de aminoácidos expuestos (Karoui et al., 2006; Lefèvre & Subirade, 1999)

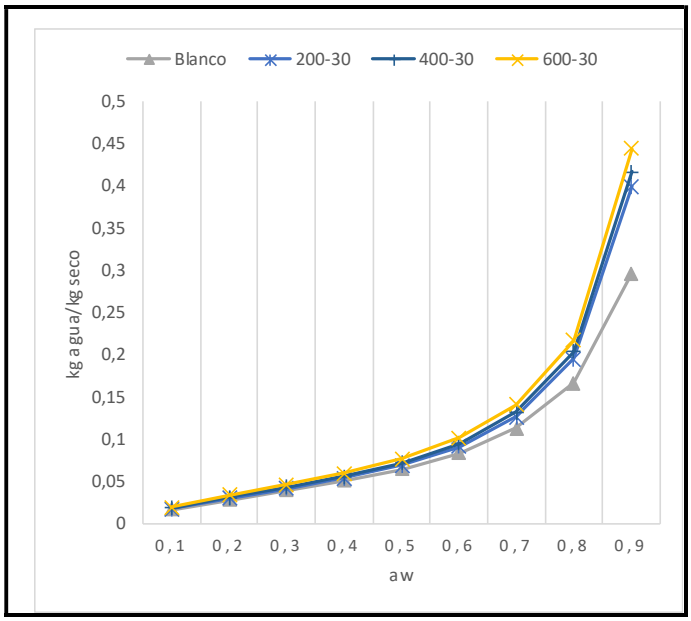


Figura 3-10 Efecto de la presión en las Isotermas de adsorción

Como se ve en la Figura 3-10 el tratamiento de alta presión aumenta alrededor del 40% la capacidad de adsorción de agua en una actividad de agua de 0,9, en el tratamiento de 600 MPa.

La evaluación del potencial Z (Figura 3-11 y 3-12) indica un aumento en la carga negativa de las partículas en la leche tratada a 600 MPa (-26,4 mV) respecto a la leche sin tratamiento (-24,0 mV), lo que podría interpretarse como una condición que favorece la adsorción.

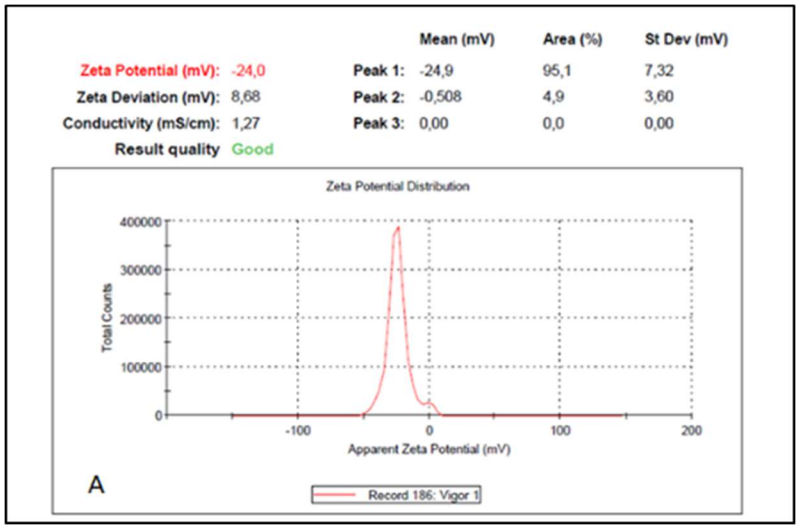


Figura 3-11 Potencial Z de leche blanco

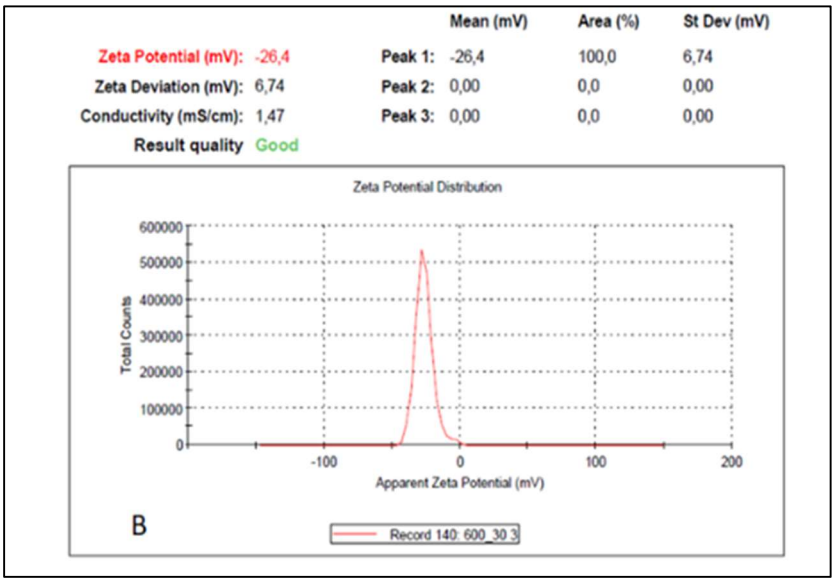


Figura 3-12 Potencial Z de leche tratada por HHP 600 MPa-30min

Se calculó el calor isostérico de adsorción (q_{st}) usando la ecuación de Clausius-Clapeyron, obteniéndose un máximo de 8,5 kJ/mol, (Tabla 3.2-9), para una humedad de 0,40 g agua/g ms, el calor isostérico disminuye en las muestras tratadas a presiones mayores, indicando que la mayor retención de agua corresponde más a un proceso físico asociado a mayor área superficial de las micelas de menor tamaño que a una interacción en la superficie de la proteína, la desnaturalización aumenta la hidrofobicidad superficial, mejorando la interacción proteína-proteína y no necesariamente la interacción proteína-agua.

Tabla 3.2-9 Valores de calor isostérico a diferentes presiones de tratamiento

	Blanco	*200-15*	*200-30*	*400-15*	*400-30*	*600-15*	*600-30*
				0,4g agua/g ms			
Qs kcal/gmol	8,5±0,06[a]	8,0±0,07[b]	7,8±0,02[c]	7,2±0,09[d]	7,0±0,09[d]	6,05±0,02[e]	6,00±0,04[f]
R^2	0,976	0,974	0,973	0,971	0,969	0,967	0,966

Valores marcados con letras diferentes en una misma fila indican que tienen una diferencia estadísticamente significativa $(p < 0{,}05)$

Los resultados de la capacidad de retención de agua por parte de las proteínas de leche sometidas a alta presión, tiene un efecto directo en la fabricación de queso donde es muy importante el rendimiento de la cuajada, en el que influye la cantidad de

proteínas desnaturalizadas asociadas a las caseínas y la cantidad de agua retenida en la cuajada (Zobrist et al., 2005)

3.1.6 Efecto de HHP sobre el tamaño de partícula

La medición de tamaño medio de partícula sobre la leche sin tratamiento muestra claramente dos picos, un primer pico con un tamaño medio de 222,8 nm que corresponde a la distribución de las micelas de caseína, y una segunda distribución con un tamaño medio de 4411nm que corresponde a los glóbulos de grasa, tal como se puede ver en la Figura 3-13

Algunos autores han observado que el tamaño de la micela de caseína puede aumentar a 250 MPa, aunque este hecho depende de varios factores, como la duración del tratamiento, el pH y la temperatura (Huppertz et al., 2004b, 2004c).

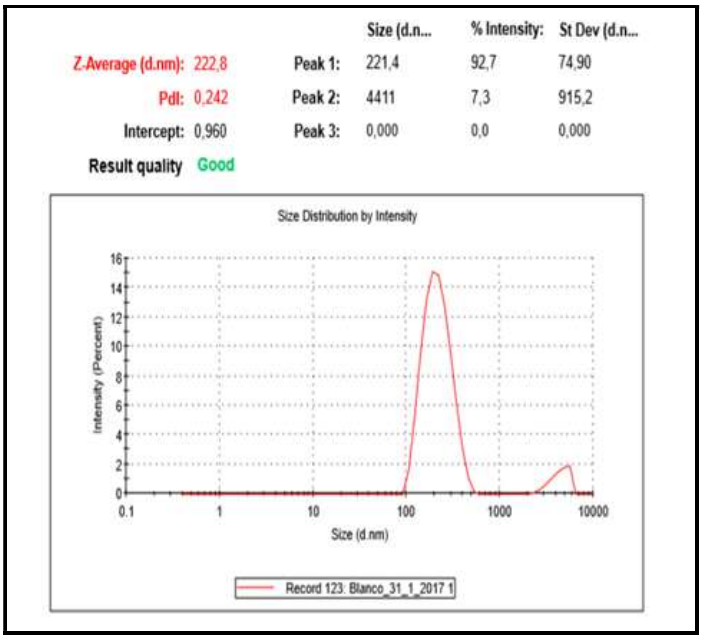


Figura 3-13 Distribución de tamaño de partícula en Leche sin tratamiento HHP

La alteración de micelas de caseína bajo presión se debe a la solubilización, así como a la disociación de interacciones hidrofóbicas y electrostáticas (Anema et al., 2005; Huppertz et al., 2004b; Regnault et al., 2004).

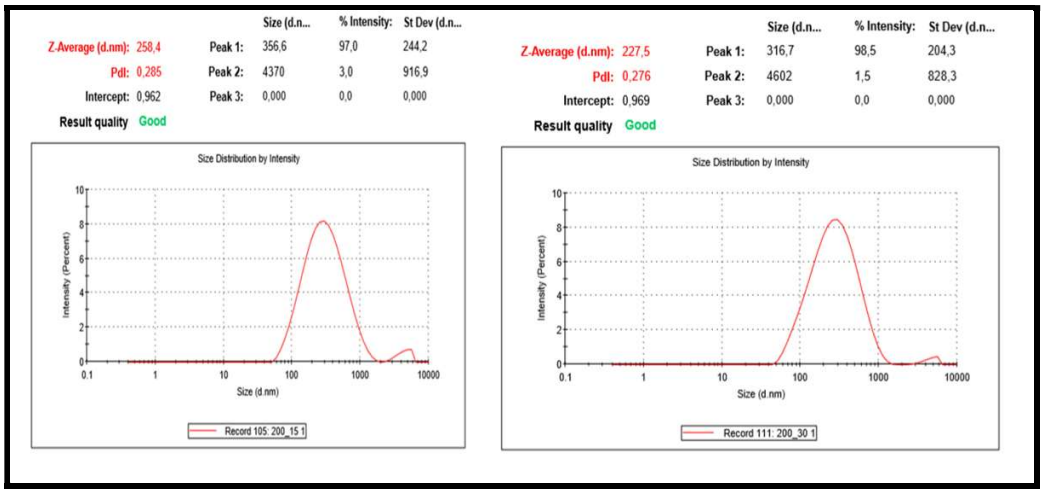


Figura 3-14 Distribución de tamaño comparado tratamiento 200MPa-15 y 30 min

El tratamiento HHP a presiones 200 MPa 15 min, muestra un fenómeno de agregación con un aumento en el tamaño medio hasta 356 nm, como se ve en la Figura 3-14, esto se debe a que estas presiones intermedias (entre 250 y 300 MPa) se favorecen las interacciones hidrofóbicas respecto a la solvatación de los residuos hidrofóbicos expuestos. La asociación se vería promovida, además, por la neutralización de las cargas negativas de las caseínas que producen los iones calcio disueltos (Anema et al., 2005; Regnault et al., 2004).

La alteración producida por HHP de las micelas de caseína causa cambios en las propiedades ópticas de la leche, tales como ligereza y poca opacidad, tal como se ve en la Figura 3-15, que sin embargo se pierde durante el almacenamiento a 4°C, confirmando lo reportado en la literatura (Anema, 2012; Centre et al., 2005; Yang, Dunker, Powers, Clark, & Swanson, 2001).

Figura 3-15 Cambio en la opacidad de la leche con el tratamiento HHP

Los tratamientos a presión mayores a 300 MPa reducen el tamaño de la micela de caseína, y no varía con el aumento de presión y se ha reportado que este cambio se mantiene aún con posteriores presurizaciones (Huppertz et al., 2004b). Estos cambios ocurren rápidamente y se acompañan de un importante aumento en el nivel de caseínas de la fase sérica, que es máximo a presiones de 250-350 MPa (Huppertz et al., 2004c; López-Fandiño, 2006).

Como se ve en la Figura 3-16 la presencia de moléculas más pequeñas de caseína se produce en la leche tratada a 600 MPa aparece como un nuevo pico de distribución en tamaños inferiores a 100nm que ha sido también reportado por otros autores (Anema et al., 2005; Penna et al., 2007)

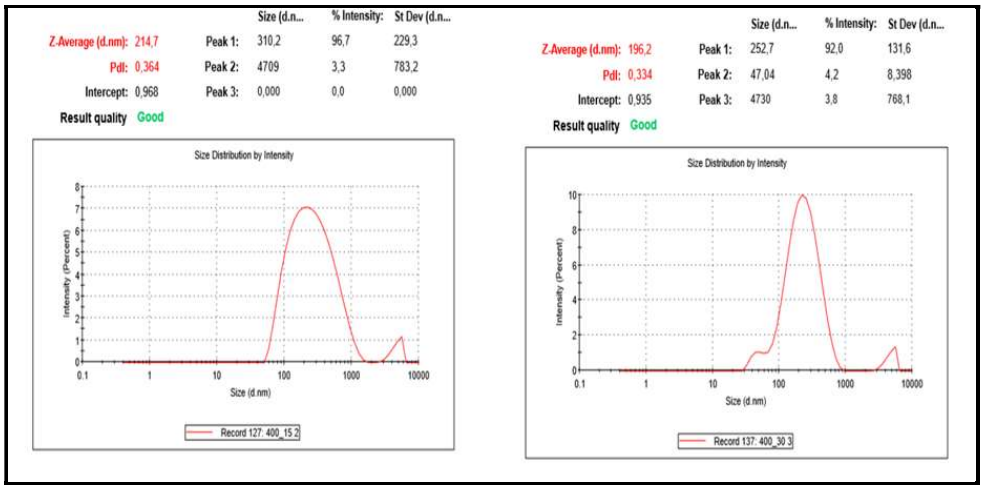


Figura 3-16 Distribución de tamaño leche tratada a 400 MPa a15 min y 30 min

Las caseínas son liberadas durante la disgregación de la micela en el orden: κ-CN, > α_{S1}-CN > α_{S2}-CN, el cual coincide con el número de residuos por molécula capaces de unir fosfato de calcio coloidal y, por tanto, de contribuir al mantenimiento de la estructura. Algunos estudios describen que cuando se mide la solubilización del fosfato de calcio coloidal, el máximo tiene lugar a 400 MPa, lo que coincide con la disrupción de la micela, visible en la aparición de un pico de distribución de tamaño de 47 nm en la muestra tratada a 400 MPa por 30 minutos (Huppertz et al., 2004c; López-Fandiño, 2006; Patel et al., 2006).

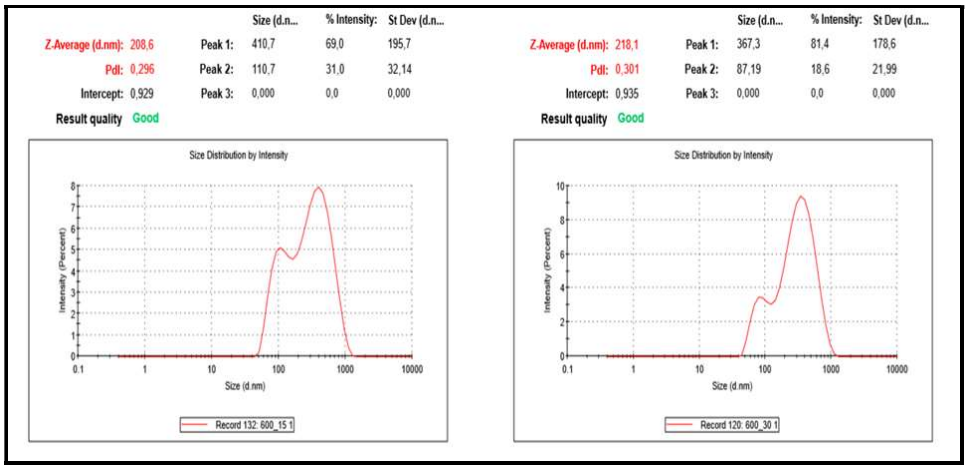


Figura 3-17 Distribución de tamaño de partícula en leche tratada a 600 MPa a 15 y 30 min

En leche tratada entre 300-600 MPa, se ha demostrado que β-Lg se asocia con las micelas de caseína (Liyanaarachchi, Ramchandran, & Vasiljevic, 2015; Patel et al., 2005). El tratamiento a 600 MPa - 30min causa una disrupción considerable de micelas de caseína con la aparición inclusive de un nuevo pico de partículas con un tamaño medio de 87 nm (Figura 3-17).

3.1.7 Efecto de HHP sobre la hidrofobicidad superficial (Ho)

Los cambios en las condiciones ambientales tales como la temperatura, el tipo de solvente, el pH y la presión durante el procesamiento tienen un profundo efecto sobre la estructura de una proteína que no es estática, por lo tanto, el equilibrio entre las fuerzas estabilizadoras de la estructura tridimensional puede cambiar a partir de cambios en las condiciones ambientales (Rahaman et al., 2016).

Las interacciones hidrofóbicas juegan un rol fundamental en las interacciones proteína–proteína, por lo tanto, la medición de la hidrofobicidad superficial se emplea como un parámetro para predecir el potencial de una proteína para asociarse y en general este parámetro se relaciona con propiedades funcionales, tales como la capacidad de formar espumas y la formación de geles (Nakai & Modler, 1996).

Los resultados de hidrofobicidad superficial corresponden a la pendiente de la regresión entre la fluorescencia y la concentración de las proteínas, tal como se ilustra en la Figura 3-18.

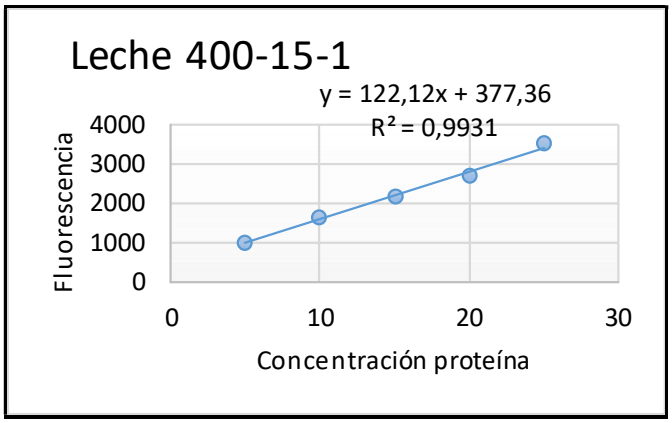


Figura 3-18 Grafico de correlación fluorescencia vs concentración de la proteína

La desnaturalización de las proteínas da como resultado la incorporación del agua en la proteína y se cree también que son inducidas a un estado de glóbulo fundido que corresponde a un estado globular, intermedio entre el estado nativo y el estado completamente desnaturalizado (Yang et al., 2001). Los resultados indican consistentemente un aumento en la hidrofobicidad superficial de las proteínas, en una relación directa con el aumento de la presión con diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos y el blanco, de la misma forma que ha sido reportado por otros autores (Goyal et al., 2013; López-Fandiño, 2006; Patel et al., 2006; Zobrist et al., 2005).

Los resultados obtenidos para las soluciones de proteínas del suero, que están constituidas principalmente por las proteínas globulares más el caseinomacropéptido, sugieren que el tratamiento de alta presión puede depolimerizar oligómeros de proteínas y desplegar monómeros de proteínas como en el caso de la β-Lg (Patel et al., 2006, 2005).

Los monómeros de β-Lg inducidos por HHP tienden a estar rodeados por residuos de aminoácidos hidrófobos, lo que resulta en un aumento de la afinidad hidrofóbica de β-Lg en la superficie, resultado del desenmascaramiento de grupos hidrófobos y un aumento de la hidrofobicidad H_0 de la proteína, tal como se ve en la Tabla 3.2-10, lo que ha sido reportado por otros autores (Hinrichs & Rademacher, 2004; Patel et al., 2006).

Tabla 3.2-10 Resultados de H_o para muestras de leche tratadas por HHP

Muestra	ANS-Leche		PRODAN-Leche	
	H_0	R^2	H_0	R^2
Blanco	78,92±4,9[a]	0,995	91,21±1,03[a]	0,996
200-15	68,98±6,5[a]	0,997	96,29±0,96[b]	0,999
200-30	65,28±4,1[a]	0,999	103,82±2,3[c]	0,992
400-15	122,87±1,3[b]	0,991	146,25±2,1[d]	0,995
400-30	133,37±1,8[c]	0,986	230,18±1,3[e]	0,990
600-15	155,6±5,1[d]	0,999	345,92±2,2[f]	0,999
600-30	154,94±1,9[e]	0,999	342,88±3,5[f]	0,993

Valores marcados con letras diferentes en una misma columna indican que tienen una diferencia estadísticamente significativa $(p < 0{,}05)$

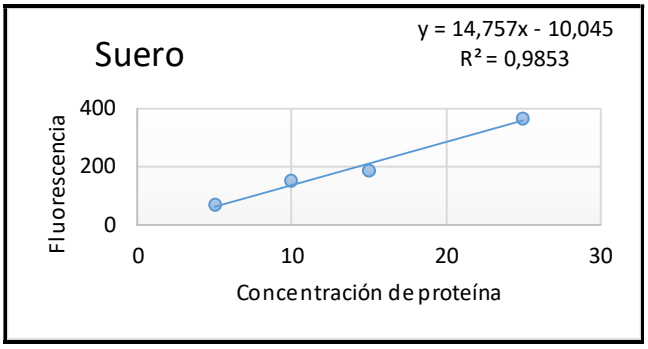


Figura 3-19Hidrofobicidad Suero tratado a 400MPa

Las proteínas pueden existir en tres estructuras distintas, termodinámicamente estables, el estado ordenado, el estado globular fundido, y el estado completamente desplegado (Thompson, 2014). En el estado de glóbulo fundido la β-Lg exhibe alta afinidad con las sondas hidrofóbicas en comparación con el estado nativo, debido a que el tratamiento con HHP resulta en un mayor acceso de los grupos SH ocultos, como se ve en los resultados en la Tabla 3.2-11 (Yang et al., 2001).

Tabla 3.2-11 Resultados de H_o para muestras de suero tratadas por HHP

Muestra	ANS-Suero		PRODAN-Suero	
	H_0	R^2	H_0	R^2
Blanco	17,36±1,1[a]	0,995	18,51±0,1[a]	0,996
200-15	14,14±0,9[b]	0,997	16,75±0,5[b]	0,999
200-30	16,24±0,5[c]	0,999	18,04±0,5[c]	0,992
400-15	33,96±0,7[d]	0,991	34,62±0,1[d]	0,995
400-30	44,05±1,0[e]	0,996	38,35±1,3[e]	0,990
600-15	52,67±1,7[f]	0,999	54,77±0,5[f]	0,999
600-30	56,61±2,1[g]	0,999	63,86±0,2[g]	0,993

Valores marcados con letras diferentes en una misma columna indican que tienen una diferencia estadísticamente significativa $(p < 0{,}05)$

Tabla 3.2-12 Resultados de H_o para muestras de Caseína tratadas por HHP

Muestra	ANS-Caseína		PRODAN-Caseína	
	H_0	R^2	H_0	R^2
Blanco	46,48±1,4[a]	0,995	38,41±3,1[a]	0,996
200-15	62,84±0,5[b]	0,997	96,29±1,0[b]	0,999
200-30	67,86±1,9[c]	0,999	103,82±2,2[c]	0,992
400-15	80,25±0,4[d]	0,991	145,46±0,8[d]	1,000
400-30	122,16±2,3[e]	0,996	230,17±1,3[e]	0,996
600-15	196,27±1,4[f]	0,999	345,92±2,2[f]	0,998
600-30	220,27±1,4[g]	0,999	348,61±3,2[f]	0,991

Valores marcados con letras diferentes en una misma columna indican que tienen una diferencia estadísticamente significativa $(p < 0{,}05)$

La formación de sitios hidrófobos en la superficie de las micelas de caseína como consecuencia de la aplicación de alta presión se verifica a través de la tasa de unión de la sonda fluorescente reflejado en el aumento de absorbancia máxima y en el aumento de la pendiente (H_0), como se ve en la Tabla 3.2-12, algunos autores correlacionan este efecto con la disminución del tiempo de coagulación de la leche tratada por alta presión, asociado a la mayor afinidad en las interacciones proteína-proteína (López-Fandiño, 2006; Patel et al., 2006).

3.1.8 Efecto de HHP sobre la estructura secundaria FTMIR

El análisis de los espectros está dividido en tres grupos, un primer grupo es la evaluación sobre la leche tratada por alta presión en comparación con el blanco experimental constituido por leche descremada pasteurizada LTSH(80°C 20 s), el segundo grupo son los coágulos drenados (quesos) obtenido en la separación por insolubilización con renina de las proteínas solubles (suero) e insolubles (queso); un tercer grupo está constituido por las proteínas solubles que conforman los sueros de coagulación.

3.1.8.1 Leches

Los análisis de las muestras de leche por FTMIR, en la zona correspondiente a los lípidos en las muestras tratadas por alta presión, muestra un aumento en el pico a ~1745 cm^{-1}, correspondiente al estiramiento de la unión C=O del grupo éster de los triglicéridos. Esto se puede interpretar como el rompimiento del glóbulo de grasa, que aumenta el número de triglicéridos, en la fase líquida, disponibles para interactuar con la radiación infrarroja.

Este aumento en la intensidad de las señales de los lípidos también es evidente en los picos a 2924 y 2853 cm^{-1} originados por los enlaces C-H de los grupos $–CH_2$. La ruptura del glóbulo de grasa también se puede apreciar en la desaparición en el análisis de partículas (DLS) de la distribución de tamaño de 4700 nm correspondiente a los glóbulos de grasa (ver Figura 3-17)

Estas observaciones se encuentran resaltadas en la Figura 3-20 con la proyección de los picos que permite apreciar las diferencias en la altura (Absorbancia) en las longitudes de onda señaladas.

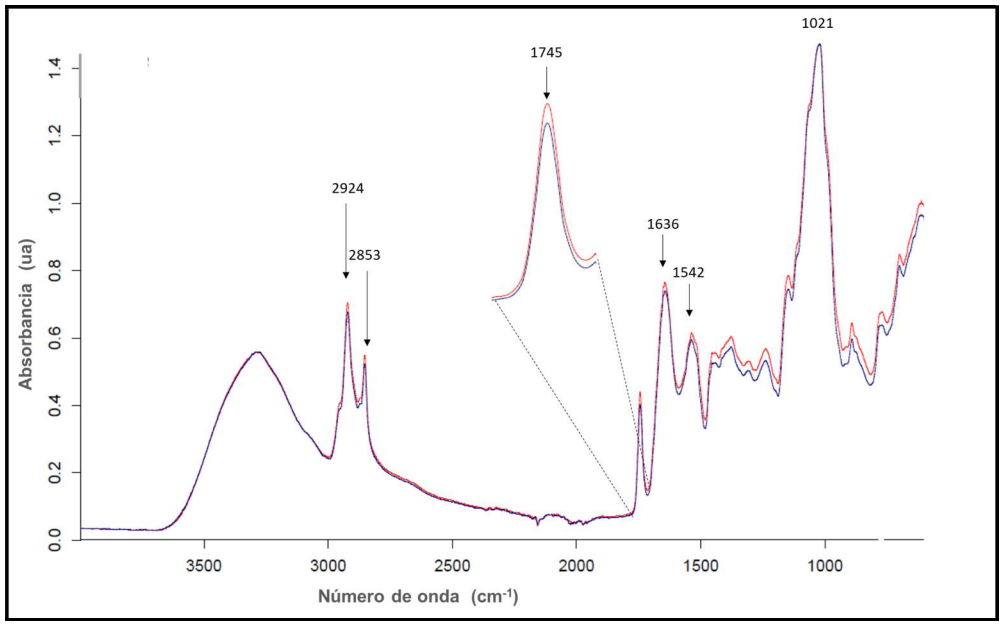


Figura 3-20 Comparación de espectros de leche no tratada-Blanco (azul) y tratada a 600 MPa-15min (rojo)

Cuando se estudia con mayor detalle la zona Amida I (1700 -1600 cm-1) utilizando la segunda derivada de los espectros (Figura 3-21), no se observan cambios que delatan una modificación fundamental en la estructura secundaria. Sin embargo, las variaciones de intensidad en las bandas a ≈ 1655 y 1631 cm^{-1}pueden indicar algún grado de modificación.

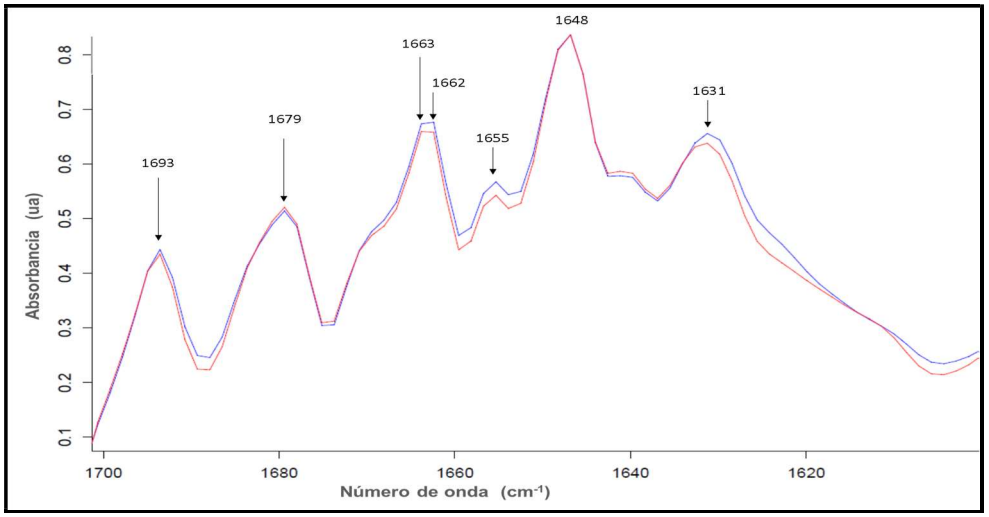


Figura 3-21 Segunda derivada de espectros de leche no tratada-Blanco (azul) y tratada a 600 MPa-15min (rojo)

3.1.8.2 Quesos

Las muestras de quesos corresponden a las proteínas insolubles, constituidas por las caseínas, y los agregados con proteínas del suero desnaturalizadas. Para facilitar la interpretación de las bandas, se dializaron las muestras para eliminar los compuestos solubles como lactosa y citratos (estos últimos absorben en las proximidades de la banda amida I).

En el espectro completo Figura 3-22 puede verse un aumento en la intensidad del pico que corresponde a la materia grasa (1745 cm^{-1}) en el queso producido con leche tratada a 600 MPa durante 15 minutos, lo que permite concluir que hay una mayor migración de la grasa hacia el coágulo protéico asociado al tratamiento de alta presión de la leche.

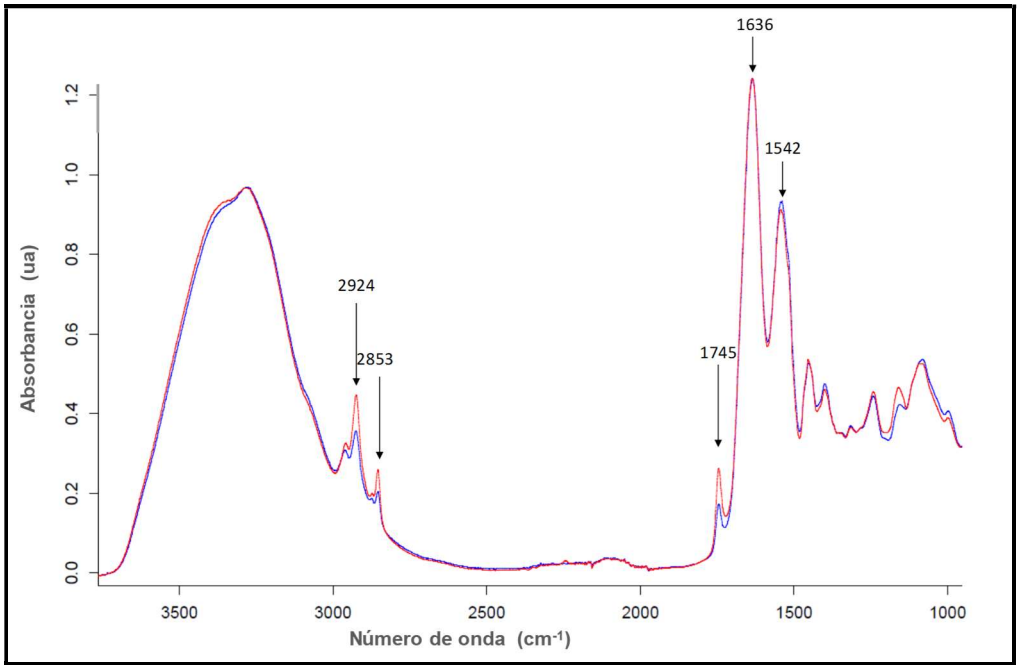


Figura 3-22 Espectros de queso dializado manufacturados con: leche no tratada - Blanco (azul) y de leche tratada a 600 MPa - 15min (rojo vivo)

Un análisis pormenorizado de la zona Amida I aplicando la segunda derivada a los espectros (Figura 3-23) confirma que existen cambios mínimos en las estructuras secundarias. La posición de las bandas permanece inalterada, mientras que la intensidad del pico a 1631 cm^{-1} aumenta ligeramente y el de 1692 cm^{-1} disminuye también ligeramente en la muestra de 600 MPa - 15 min indicando posibles modificaciones en las estructuras de lámina β. La única conclusión que se puede dar es que las caseínas no parecen sufrir modificaciones fundamentales en su estructura secundaria asociadas al tratamiento por alta presión. Los espectros son similares a los

de la leche y por lo tanto dominados por las caseínas sin mostrar prácticamente alteraciones estructurales.

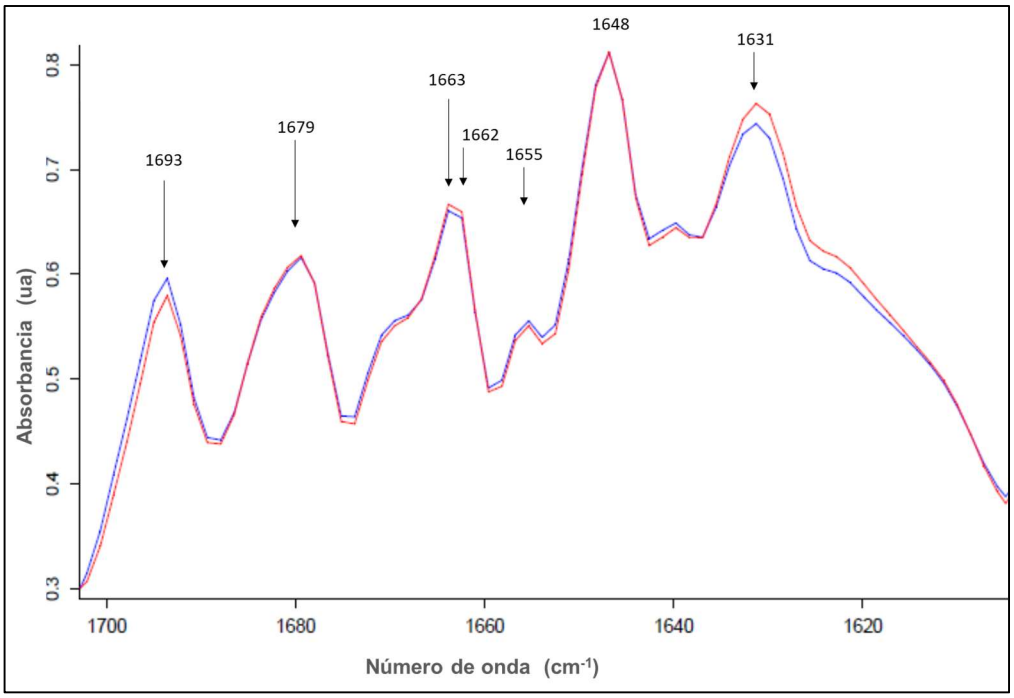


Figura 3-23 Segunda derivada de espectros de quesos de leche no tratada-Blanco (azul) e tratada a 600 MPa - 15min (rojo)

3.1.8.3 Sueros

El espectro completo de los sueros sin dializar Figura 3-24, muestra fuertes bandas de absorción en la zona correspondiente a la lactosa (1021 cm^{-1}) y al ácido cítrico y a los citratos (1720 - 1600 cm^{-1}) que pueden ocasionar enmascaramiento de la banda amida I. Se puede observar que el pico correspondiente a los grupos éster ~1745cm^{-1} disminuye en los sueros de las leches tratadas, sugiriendo que una mayor cantidad de lípidos quedan atrapados en la estructura tridimensional de las cuajadas de leche tratada a alta presión.

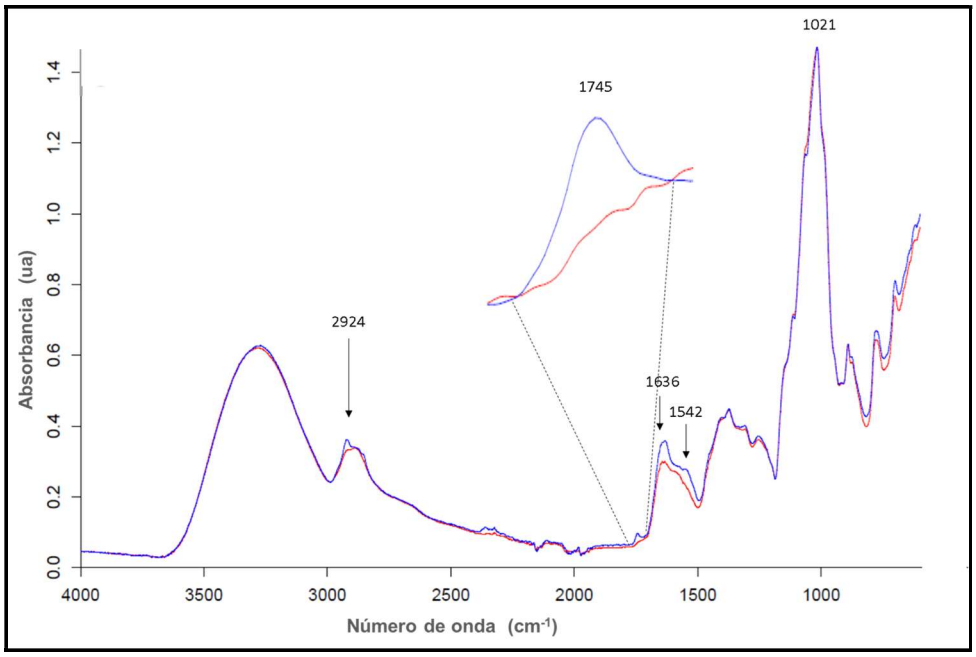


Figura 3-24 Espectro completo sueros sin dializar, Blanco (azul);600 MPa y 15 min(rojo)

Este efecto se observa igualmente en el espectro de los sueros dializados (Figura 3-25). Esta observación confirma lo verificado en los quesos donde se observa efectivamente un aumento en el pico de 1745 cm^{-1} en las muestras provenientes de leches tratadas (ver Figura 3-20).

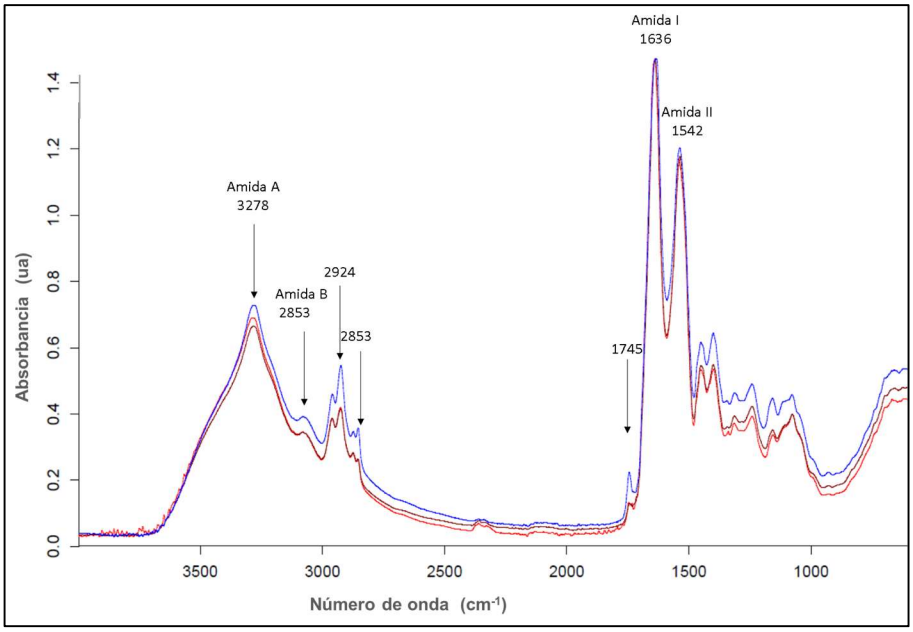


Figura 3-25 Espectro de sueros dializados: suero de leche sin tratamiento (azul); suero de leche tratada a 400 MPa - 15 min (rojo oscuro); suero de leche tratada a 600 MPa – 15 min (rojo vivo).

El análisis de la banda Amida I, en la segunda derivada de los espectros de los sueros, muestra un gran efecto del tratamiento sobre las estructuras secundarias de las proteínas Figura 3.26.

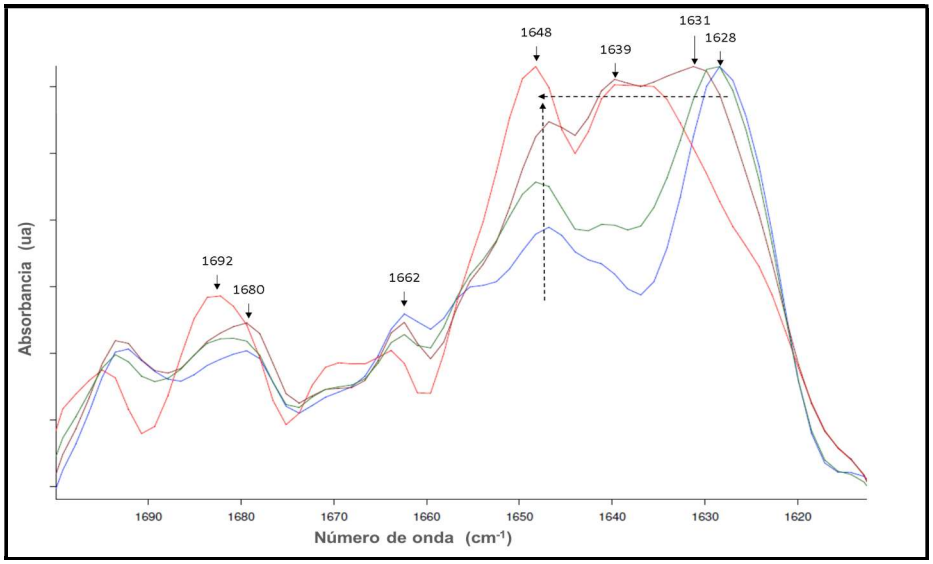


Figura 3-26 Segunda derivada de los espectros de suero dializado: blanco (azul) 200-15 (verde); 400 - 15 (rojo oscuro) y 600 - 15 (rojo)

En la Figura 3-26 se presentan los resultados de los sueros testigo, así como los tratamientos a 200, 400 y 600 MPa durante 15 minutos. El efecto más notable es el aumento del pico a 1648 cm^{-1} a medida que aumenta la presión del tratamiento. Este pico corresponde a la estructura de bobina aleatoria, el cual está asociado al despliegue de proteínas en una estructura más extensa.

Igualmente es evidente la disminución de intensidad del pico a 1628 cm^{-1} en función del aumento de la presión del tratamiento. Esta banda se atribuye a la existencia de láminas β anti-paralela intermolecular entre dos monómeros β-Lg en su forma dimérica, la cual disminuyó a 400 MPa - 15 min y luego desapareció completamente a 600 MPa - 15 min. Esto sugiere que, las formas dimérica β-Lg se disociaron en la desnaturalización; además, aumentó la intensidad en los picos de ~ 1680 cm^{-1} en los sueros correspondientes a los tratamientos a 200 y 400 MPa, mientras que en el suero de 600 MPa aparece una banda amplia e de intensidad media a ~1692 cm^{-1}, que se pueden asignar a estructuras extendidas de láminas β y de láminas β anti paralelas, sugiriendo que los agregados recién formados consisten en láminas β. En resumen, las láminas β (1628 cm^{-1}) disminuyen con el tratamiento por presión, mientras que las estructuras desordenadas aumentan (1648 cm^{-1}), así como las estructuras extendidas de láminas β que pueden formar nuevos agregados (1680 – 1692 cm^{-1}).

El análisis de los espectros de la leche, los quesos y los sueros nos permite hacer observaciones sobre el comportamiento de la grasa en estos productos. Ya fue mencionado que existe un aparente aumento de la grasa en las leches tratadas. La Figura 3-27 muestra este aumento en función de la presión aplicada. Esto se explica cómo un aumento de los triglicéridos de ácidos grasos de cadenas más cortas que se liberan en la fase acuosa por la ruptura de los glóbulos de grasa ocasionado por la presión.

También se menciona que la grasa migra del suero hacia la cuajada como resultado de la aplicación de alta presión y este efecto se puede apreciar en la banda de 1745 cm^{-1} (Figura 3-27). Al observar la zona de los grupos C-H podemos apreciar que existen diferencias en las poblaciones de grupos CH_2 y CH_3. En los quesos de leche tratada los grupos CH_2 son más abundantes que los CH_3. Esto significa que los triglicéridos de ácidos grasos de cadena más larga pasan preferencialmente a la cuajada, mientras que el suero se enriquece en triglicéridos de ácidos grasos de cadena corta.

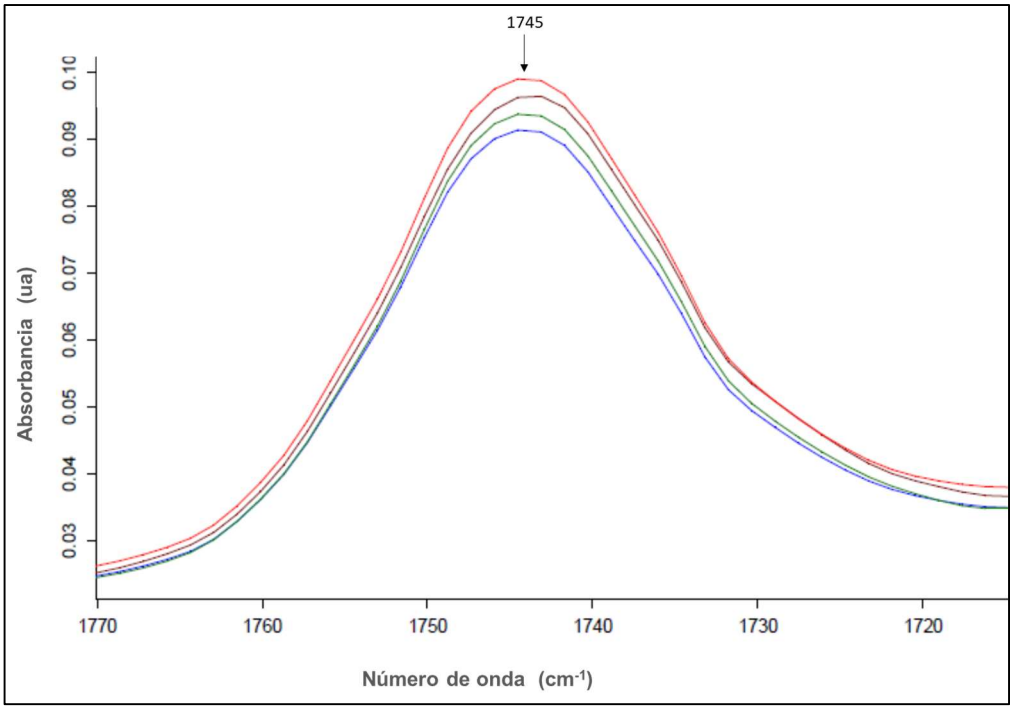


Figura 3-27 Espectro de la correspondiente a la absorción de los grupos éster en la leche. Leche testigo (azul); 200 MPa - 15 min (verde); 400 MPa - 15 min (rojo oscuro); 600 MPa 15 min (rojo vivo).

El examen de los espectros de los sueros en la misma región espectral (Figura 3-28) nos permite confirmar esta observación: Las señales correspondientes a las vibraciones CH_2 a 2924 y 2853 cm^{-1} son más intensas en los quesos que en los correspondientes en los sueros. En los sueros se puede apreciar que las señales de las

vibraciones C-H del grupo CH_3 son más visibles, cuando se comparan con los picos del CH_2. Los sueros están enriquecidos en triglicéridos de ácidos grasos de cadena corta.

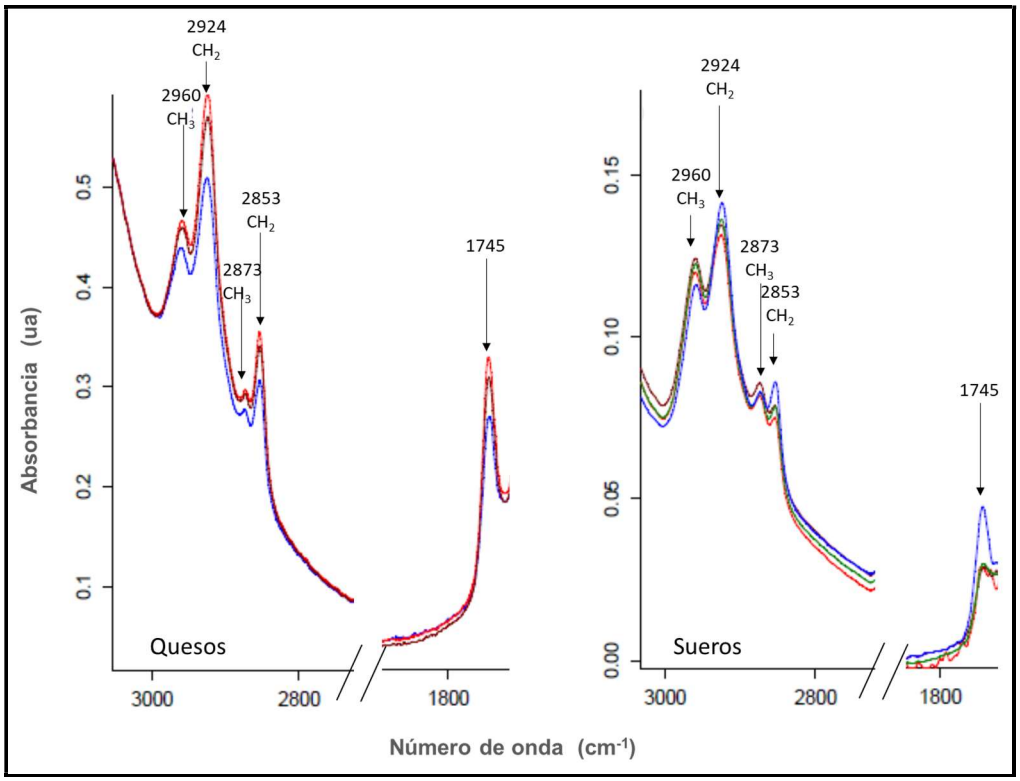


Figura 3-28 Espectros en la zona espectral de absorción de los lípidos. Blanco (azul); 200 MPa - 15min (verde); 400 MPa - 15 min (rojo oscuro); 600 MPa - 15 min (rojo vivo).

Esto tiene importancia desde el punto de vista nutricional para los productos que puedan ser desarrollados a partir de este tipo de sueros, dado que el metabolismo de los ácidos grasos de cadena corta y de cadena larga es diferente y está reportado que los ácidos grasos de cadena corta traen beneficios a la salud, es por esto que se utilizan en nutrición enteral y parenteral debido a la buena absorción que presentan; y en fórmulas lácteas en niños prematuros para mejorar la absorción de calcio. Estos ácidos grasos han despertado interés especialmente por su posible papel en el tratamiento y prevención de la obesidad. Al ser más hidrosolubles, no se incorporan a los quilomicrones y no participan directamente en la lipogénesis. Son capaces de aumentar el efecto termogénico de los alimentos y en su metabolización elevan la formación de cuerpos cetónicos con el consiguiente efecto en la disminución del apetito (Sáyago-Ayerdi, Vaquero, Schultz-Moreira, Bastida, & Sánchez-Muniz, 2008).

3.1.9 Efecto de HHP sobre la microestructura SEM

El queso producido a partir de leche pasteurizada a baja temperatura que constituye el blanco de estos experimentos, muestra una estructura abierta con numerosas cavidades irregulares, mientras que el queso producido con leche presurizada a 400 MPa por 30 minutos, exhibió una distribución de matriz la proteína más regular y cerrada (Figura 3-29).

Estos resultados concuerdan con las observaciones de otros autores, sobre la microestructura de queso Cheddar fabricado con leche de vaca cruda, pasteurizada térmicamente y presurizada (Padiernos et al., 2009).

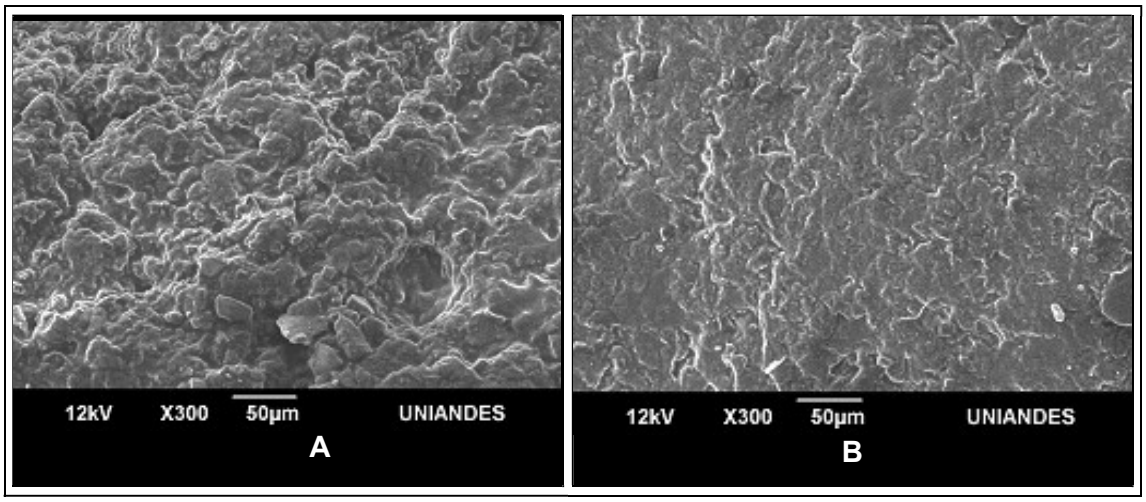


Figura 3-29 (A) Microestructura de queso producido con leche pasteurizada, blanco LTST 80°C 20S; (B) Microestructura de queso con leche tratada a 600MPa - 30min

Según varios autores la presión aplicada a la leche resulta en la supresión de la interacción hidrófoba entre las caseínas dentro de las micelas, liberando caseínas y pequeños grupos de caseína, la estructura original no se recupera y las micelas formadas son más pequeñas tal como se discutió en la sección de evaluación del tamaño de partícula.

Durante la reorganización de las micelas, la β-lacto globulina desnaturalizada podría formar enlaces disulfuro con k CN y α_{s2} caseínas, o formar polímeros auto agregados, lo que podría llevar a una estructura más cerrada de los geles de cuajo.

3.1.10 Efecto del tratamiento con Ultrasonido

La experimentación se llevó a cabo manteniendo el montaje descrito en el capítulo de materiales y métodos, manteniendo sumergido el vaso de tratamiento en un baño de hielo para controlar la temperatura. La leche se adiciono con cloruro de calcio en concentración de 250 ppm (Pardo & Almanza, 2003).

Para aplicar los tratamientos se siguió el diseño experimental central compuesto, la Tabla 3.3-1 muestra la combinación de las variables, los ensayos se desarrollaron de materia aleatoria.

Tabla 3.3-1 Diseño experimental para el tratamiento de ultrasonido

Variables codificadas		Variables naturales	
X1	X2	P(W)	t (min)
0	1,4142	173	10
0	-1,4142	173	1
-1	1	141	9
0	0	173	6
0	0	173	6
1	1	205	9
-1,4142	0	128	6
1	-1	205	2
0	0	173	6
0	0	173	6
1,4142	0	218	6
-1	-1	141	2
0	0	173	6
		Blanco	

3.1.11 Efecto del ultrasonido sobre le rendimiento quesero

Con el fin de analizar estadísticamente la influencia de las variables de potencia y tiempo sobre el rendimiento quesero, se realizó un análisis de varianza en la cual se observa que el modelo polinómico propuesto permite predecir la variable de respuesta ($p = 0{,}006$); las variables evaluadas en el diseño de experimentos se ven afectadas por la potencia del ultrasonido ($p = 0{,}002$), la relación cuadrática de la potencia ($p = 0{,}024$) y la relación del tiempo al cuadrado ($p = 0{,}0135$).

En la Figura 3-30 se puede ver el sistema de lira implementado para hacer uniforme el tamaño de corte, así como la cuajada cortada para la separación de suero.

El mayor rendimiento quesero (17,1%) se obtuvo a una Potencia de 218 W y a un tiempo de sonicación de 6 minutos; superior al rendimiento obtenido para el control (13.42%).

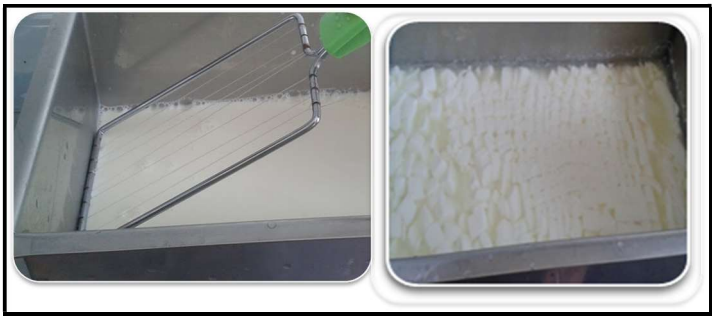


Figura 3-30 Sistema de corte de cuajada, tamaño del grano

En la Tabla 3.3-2, se observan los resultados de los distintos tratamientos sobre el rendimiento, la humedad, la sineresis y el contenido de proteína en el suero, todos estos resultados relacionados entre si con el proceso de coagulación.

Probablemente el aumento del rendimiento se debe atribuir a que las fuerzas de cizalla producidas por el ultrasonido, provocan cambios en las micelas agregadas modificando las uniones fosfocálcicas y puentes disulfuro entre las paracaseínas afectando la formación de redes proteicas que aumentan la retención de agua dentro del queso, lo que se ve reflejado en el aumento del peso en el coagulo (Gülseren et al., 2007; Liu et al., 2014).

Tabla 3.3-2 Resultados de rendimiento, humedad, sinéresis y proteína en el suero de muestras tratadas con ultrasonido

Tratamiento	*pH*	*Rendimiento % w/w*	*Proteína en el suero mg/ml*	*Humedad %*	*Sineresis %*
Blanco	7,07±0,1^{a}	13,80±1,1^{a}	0,09±0,01^{a}	50,90±2,5^{a}	7,00±0,1^{a}
128-6	7,06±0,1^{a}	14,54±0,9^{b}	0,08±0,02^{a}	50,86±2,0^{a}	9,02±0,1^{b}
141-2	7,12±0,2^{b}	14,26±1,2^{b}	0,07±0,01^{b}	51,26±1,5^{b}	9,65±1,1^{c}
141-9	7,65±0,1^{c}	13,42±0,8^{c}	0,07±0,02^{b}	50,86±2,0^{a}	9,8±1,1^{c}
173-1	7,12±0,1^{b}	14,26±1,2^{b}	0,07±0,15^{b}	50,91±1,8^{a}	15,12±1,1^{d}
173-6	7,08±0,1^{a}	14,91±0,1^{d}	0,06±0,02^{b}	51,90±2,0^{c}	17,08±1,1^{e}
173-10	7,07±0,1^{a}	14,31±1,1^{b}	0,06±0,02^{b}	51,92±2,0^{c}	17,23±2,1^{e}
205-2	7,12±0,2^{b}	14,25±0,2^{b}	0,06±0,02^{b}	55,64±2,5^{d}	27,12±5,2^{f}
205-9	7,27±0,1^{d}	14,54±0,6^{b}	0,05±0,02^{c}	55,94±1,3^{d}	27,27±3,1^{f}
218-6	7,24±0,3^{e}	17,10±0,8^{d}	0,04±0,01^{d}	64,21±1,0^{e}	32,24±2,3^{g}

Valores marcados con letras diferentes en una misma columna indican que tienen una diferencia estadísticamente significativa $(p < 0{,}05)$

Los efectos físicos de la cavitación conducen a un tamaño medio de partículas más pequeño y una mayor presencia de agregados solubles en la leche, esto causa un aumento en el área superficial de las partículas de caseína en la leche. La presencia de agregados más pequeños inducidos por ultrasonido aumenta la formación del gel de cuajo y la inclusión de agua en su interior (Liu et al., 2014).

En la Figura 3-31 se muestra la superficie de respuesta que relaciona el rendimiento quesero y los diferentes tratamientos propuestos en el diseño experimental.

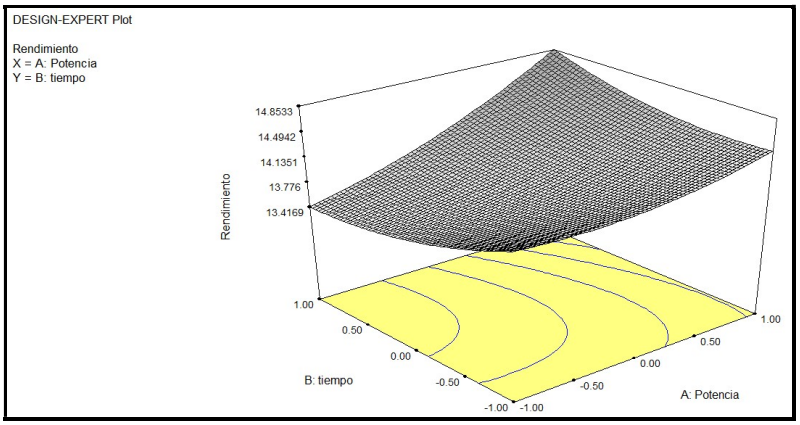


Figura 3-31 Superficie de respuesta de rendimiento quesero

La Ecuación 3.3.1-1 muestra la relación de las variables potencia y tiempo en la optimización del rendimiento quesero.

Ecuación 1.1.1-1

$$y = 13{,}87 + 0{,}44\ x_1 - 0{,}06x_2 + 0{,}28x_1x_2 + 0{,}16x_1^2 + 0{,}17x_2^2$$

Donde X_1 corresponde a la potencia X_2 corresponde al tiempo

El mayor contenido de humedad (64.21%) se dio en el queso producido con leche sometida a una Potencia de 218 W y a un tiempo de tratamiento de 6 minutos; mientras que el control presentó una humedad de 50.9%. El análisis de varianza indica que la interacción de las variables independientes se explica por el modelo cuadrático $(p = 0{,}0070)$. La variable que más afecta el contenido de humedad es la potencia ($p = 0{,}0008$).

Por su parte la sinéresis en todos lo tratamiento siempre fue mayor a la obtenida por el control (7%); en la muestra sonicada a 218 W durante 6 minutos ocurrió un mayor drenado (32%). A partir del análisis de varianza se estableció que el modelo de interacción de las variables se ajusta ($p = 0{,}0466$); al igual dentro de las variables

evaluadas en el diseño de experimentos la potencia $(p = 0{,}0256)$ y la relación potencia – tiempo $(p = 0{,}0384)$ tiene influencia sobre la sinéresis.

Los resultados de la capacidad de retención de agua muestran evidentemente un aumento con el aumento en la potencia y el tiempo de tratamiento, esto se refleja en el rendimiento quesero por un mayor peso de la cuajada y un aumento significativo en el contenido de humedad, sin embargo esta capacidad no se mantiene en el largo plazo, debido a que la humedad no se encuentra ligada en las estructura, sino atrapada en la microestructura del gel que al ser sometido a calentamiento moderado y posterior centrifugación se escapa de la estructura aumentando notablemente la sinéresis.

La Figura 3-32 muestra el comportamiento de la humedad en la cuajada con relación a las variables de potencia y tiempo.

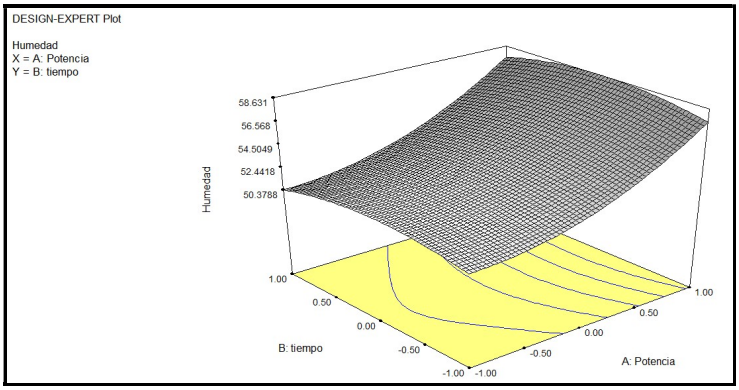


Figura 3-32 Superficie de respuesta del contenido de humedad en la cuajada

El menor contenido de proteína soluble en el suero (0.04 mg/ml) se presentó en el tratamiento aplicado a 218W durante 6 minutos; comparando con la proteína presente en el control (0,09 mg/ml).

En el caso de la proteína, es la potencia $(p > 0{,}0001)$ y el cuadrado de la potencia $(p = 0{,}0003)$ los que tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la concentración de proteína. El modelo cuadrático explica el comportamiento (R^2 0,93), es decir a mayor potencia del tratamiento menor contenido de proteína en el suero, independiente del tiempo del proceso.

$$y = 0{,}11 - 0{,}023 \quad x_1 - 0{,}012x_1^2$$

Donde $x1$ corresponde a la potencia

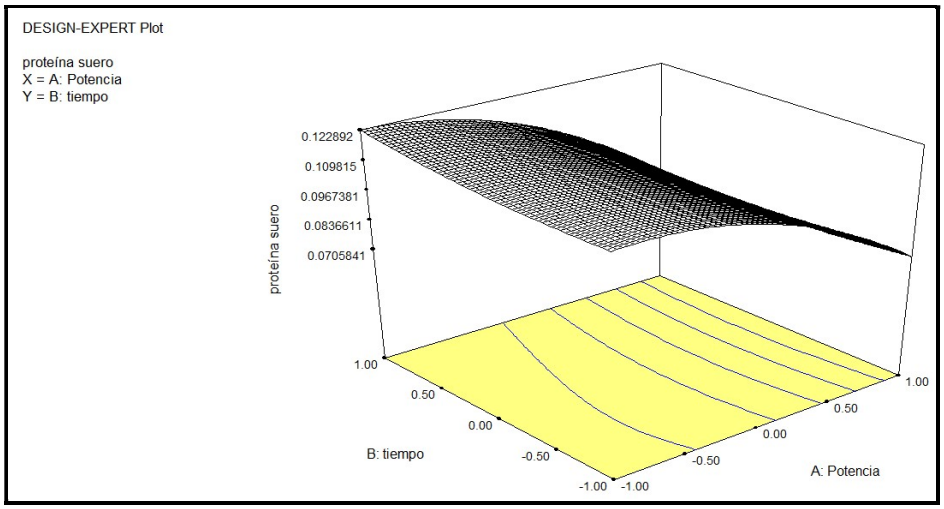


Figura 3-33 Superficie de respuesta del contenido de proteína en el suero.

Se puede argumentar que el ultrasonido afecta la concentración final de proteína en el suero, por un proceso de desnaturalización de las proteínas solubles que se acoplan a las caseínas y precipitan en la cuajada en mayor proporción que los cambios por la solubilización de las caseínas o la presencia de caseinomacropéptido (CMP) derivado de la coagulación enzimática. Esto se puede atribuir al fenómeno de cavitación, ya que logra alterar los enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas responsables de asociación intermolecular de proteínas (Gülseren et al., 2007; Liu et al., 2014; Zhao et al., 2014). Además se ha reportado también una disminución significativa en el peso molecular y fraccionamiento de proteínas (Jambrak, Lelas, Herceg, Mason, & Paniwnyk, 2014; Silva et al., 2018) y un cambio de la estructura proteica como respuesta a las fuerzas de cizalla producidas por el ultrasonido que cambia la hidrofobicidad superficial y la estructura secundaria y terciaria (Chandrapala, Zisu, et al., 2012). Otros trabajos han reportado este mismo fenómeno y es atribuido al incremento de la liberación de los grupos sulfhídrilo y a la formación de agregados proteicos insolubles (Jambrak et al., 2014; Liu et al., 2014).

3.1.12 Efecto del Ultrasonido sobre la textura

La textura del queso está directamente relacionada con el cambio producido por la cavitación sobre la estructura de las proteínas, produciendo en los quesos de mayor rendimiento una estructura menos elástica y frágil. Los resultados de los atributos texturales muestran que existen diferencias significativas entre las muestras. La dureza del gel aumentó con el aumento de la potencia, hasta 173 W por 10 minutos, pero a potencias superiores los valores de dureza disminuyen casi a los niveles de la leche sin tratamiento.

Figura 3-34 Muestras de queso para análisis de textura

La dureza disminuye con el tratamiento en relación al blanco, cuando la potencia sube de 205 W las muestras se hacen más blandas al punto de no tener la cohesión suficiente para permitir el moldeado de la cuajada, lo que puede deberse a la adhesión aumentada que impide la formación de un cuerpo homogéneo, se reduce la estructura de formación de gel y no se permite la formación de una red homogénea (Chandrapala, Martin, et al., 2012; Gülseren et al., 2007; Shanmugam, Chandrapala, & Ashokkumar, 2012). Estos resultados se aprecian en la Figura 3-35, donde se ve que la máxima dureza se alcanza a 173 W - 10 min.

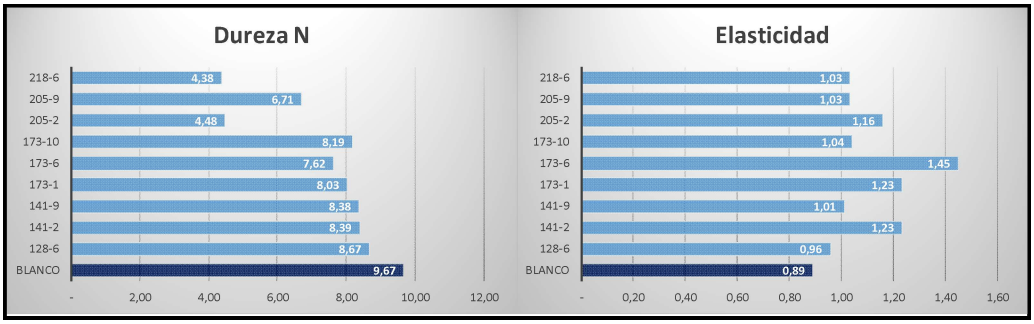


Figura 3-35 Comparativo dureza y Elasticidad de muestras tratadas por ultrasonido

$$y = 6{,}97 + 0{,}09x1 - 0{,}96 \quad x2 + 0{,}037x_2^2$$

La ecuación describe la interacción de las variables potencia y tiempo, el efecto de la potencia es positivo para la dureza y son la potencia, el tiempo y el cuadrado del tiempo los factores que maximizan la dureza. El análisis estadístico de la dureza indica ajuste a un modelo cuadrático (R^2 = 0,80) donde la potencia es el factor significativo (p = 0,003), la superficie de respuesta que ilustra este comportamiento aparece en la Figura 3-36.

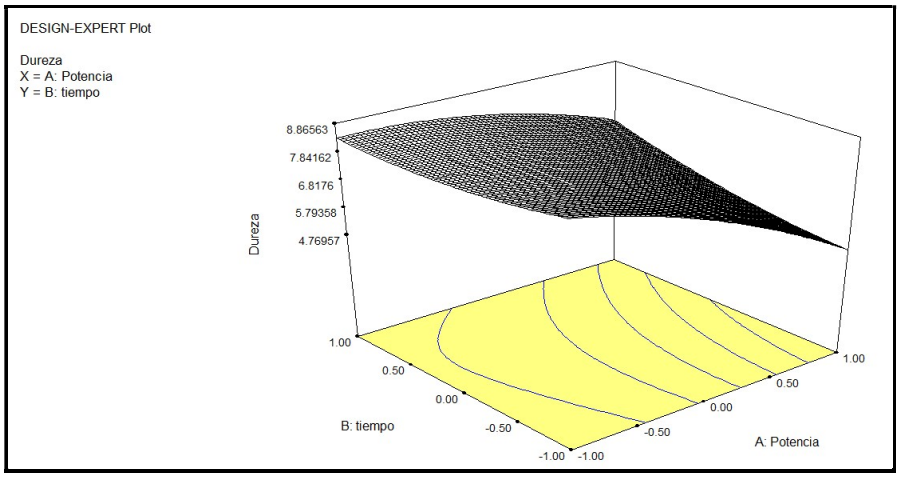


Figura 3-36 Superficie de respuesta de la relación de las variables y la dureza

La cohesividad, que es la resistencia a la tracción y manifiesta la fuerza dentro de las muestras, aumenta mientras que la elasticidad disminuye, esto significa que el tratamiento de ultrasonido puede fortalecer la interacción, especialmente de las proteínas entre si (Liu et al., 2014).

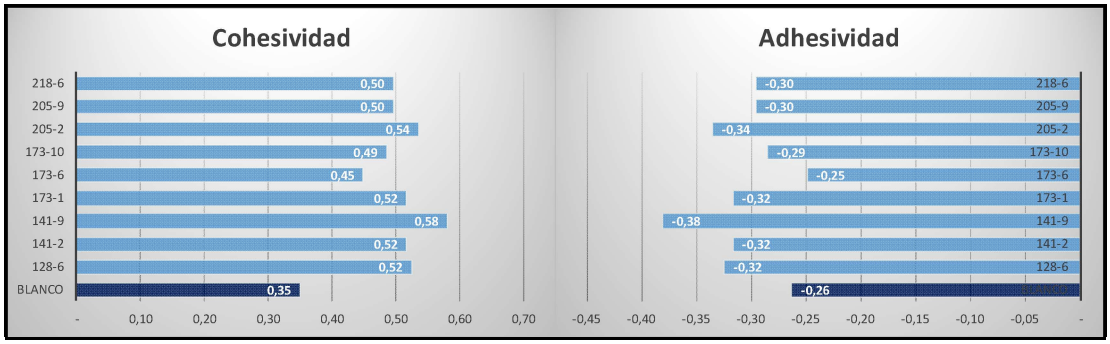


Figura 3-37 Comparativo cohesividad-adhesividad

Los tratamientos de ultrasonido tuvieron influencia en la interrelación de componentes de la leche y en la calidad estructural y, por lo tanto, modificó los atributos texturales de los coágulos. La dureza, que es la máxima energía requerida para una deformación específica es una indicación de la fuerza de los enlaces internos dentro de una estructura y tiene una gran influencia en la percepción sensorial de la textura de los alimentos (Gutierrez-Mendez et al., 2013).

Estos cambios en las propiedades texturales se pueden explicar por qué la cavitación en la leche provoca agregados hidrófobos, y se espera que la β-Lg participe en el proceso de agregación a través de interacciones hidrofóbicas. Las fuerzas de corte generadas a partir de la cavitación tendrían un efecto en el desdoblamiento de la β-Lg que seguramente provocara la asociación de las proteínas del suero entre ellas vía los

restos hidrófobos expuestos. Además, las proteínas de suero desnaturalizadas podrían formar agregados también con las caseínas (Chandrapala, Zisu, et al., 2012).

Otras investigaciones han explicado este fenómeno de agregación entre la β-Lg desplegada y la β-Lg auto agregada y la agregación con BSA y κ-CN a través del intercambio de disulfuro, ya que la β-Lg nativa contiene un tiol libre y tiene la capacidad de formar enlaces disulfuro entre β-Lg desnaturalizada y κ-CN (Liu et al., 2014).

Se ha reportado también un efecto similar del ultrasonido sobre la dureza de los geles de proteína como resultado del Incremento de los enlaces disulfuro. Las reacciones entre los enlaces disulfuro dentro del mismo monómero β-Lg generan monómeros no nativos que pueden ser intermedios en los procesos de agregación intermolecular con la κ-CN, que es una proteína polimérica heterogénea, todos estos fenómenos son análogos a los que se dan durante un tratamiento térmico (Zhao et al., 2014).

3.1.13 Efecto del Ultrasonido sobre el color

La diferencia de color CIE-LAB (∆E*) es numéricamente la diferencia de percepción de color, para el ojo humano, entre dos muestras del alimento y se define como el índice general de diferencia de color. Los valores de ∆E* obtenidos para una muestra en referencia al estándar permiten evidenciar si el observador podrá o no percibir la diferencia de color.

El color se torna más oscuro a medida que se incrementa la potencia y el tiempo de tratamiento. Se estima que el color es principalmente el resultado de tres tipos de reacciones generales que, dadas las condiciones del proceso, se producen en el sistema constituido por leche y azúcares: pardeamiento tipo Maillard, reacciones de caramelización y reacciones de oxidación (Rahaman et al., 2016). Para la diferencia de Color todos los tratamientos mostraron diferencias mayores en comparación con el control y la mayor diferencia se presentó a una Potencia de 218 W durante 6 minutos, tal como se ve en la Tabla 3.3-3.

Dado que los valores de ΔE en todo caso son inferiores a 3, las diferencia son apenas perceptibles entre dos niveles de intensidad del estímulo sensorial, es decir una diferencia de color muy difícilmente apreciable. Además, el análisis de varianza indica que el modelo polinómico no explica suficientemente la interacción de las variables ($p = 0{,}4645$), lo que indica que desde el punto de vista estadístico las variables, potencia y tiempo en el rango de experimentación, no tienen un efecto significativo sobre el color (Rahaman et al., 2016).

Tabla 3.3-3 **Efecto del tratamiento de ultrasonido sobre el cambio de color**

Tratamiento	*Color ΔE*
128-6	0,62±0,01[a]
141-2	0,74±0,02[b]
141-9	0,75±0,01[b]
173-1	0,76±0,01[b]
173-6	0,83±0,01[c]
173-10	0,91±0,02[d]
205-2	0,92±0,01[d]
205-9	0,92±0,02[d]
218-6	0,99±0,01[e]

Valores marcados con letras diferentes en una misma columna indican que tienen una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0{,}05$)

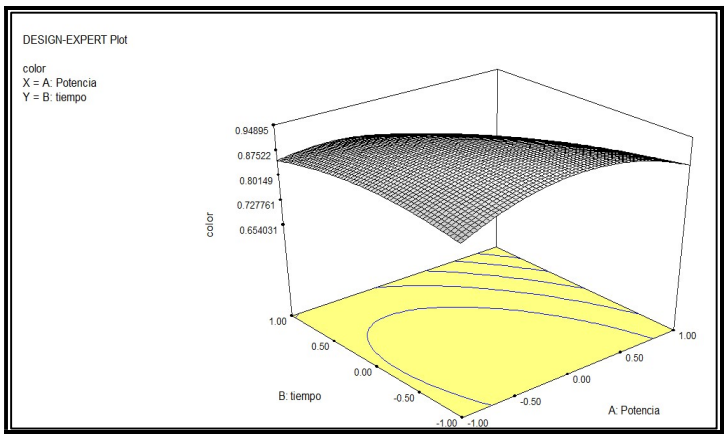


Figura 3-38 Superficie de respuesta para el efecto de ultrasonido sobre el color

La superficie de respuesta no indica de manera clara un máximo de respuesta de color en el espacio experimental probado.

3.1.14 Efecto del Ultrasonido sobre el tamaño de partícula

Los resultados de la distribución del tamaño de partícula han demostrado que, después del tratamiento con ultrasonido se causó una disminución en el tamaño de partícula, se redujo su distribución y aumentó significativamente la superficie libre específica en todas las muestras (Tabla 3.3-4).

Este estudio mostró que el tratamiento con ultrasonido 218 W - 6 minutos de redujo significativamente el tamaño del agregado y el volumen hidrodinámico, sin embargo, no hay diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos, pero si con el blanco (Figura 3.39).

Tabla 3.3-4 Tamaño de partícula y potencial Z de muestras tratadas por ultrasonido

Tratamiento	*Tamaño*		*Potencial Z*
Blanco	302±15,3a	-	26,0
128-6	281±12,9b	-	25,8
141-2	313±16,3a	-	24,7
141-9	288±13,9b	-	23,4
173-1	280±13,0b	-	25,7
173-6	287±12,9b	-	24,8
173-10	276±12,9b	-	23,8
205-2	291±12,8b	-	24,9
205-9	264±11,6b	-	26,9
218-6	276±11,4b	-	27,6

Valores marcados con letras diferentes en una misma columna indican que tienen una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0{,}05$)

La reducción en el tamaño de las micelas se atribuyó a las fuerzas de cizallamiento hidrodinámicas asociadas con las cavitaciones ultrasónicas, además, los datos de carga de la superficie de la partícula en la Tabla 3.3-4 mostraron una disminución de carga con el aumento del tiempo de sonicación, que denota la exposición inicial de las zonas cargadas durante el despliegue de proteínas y la agregación de las proteínas desplegadas respectivamente.

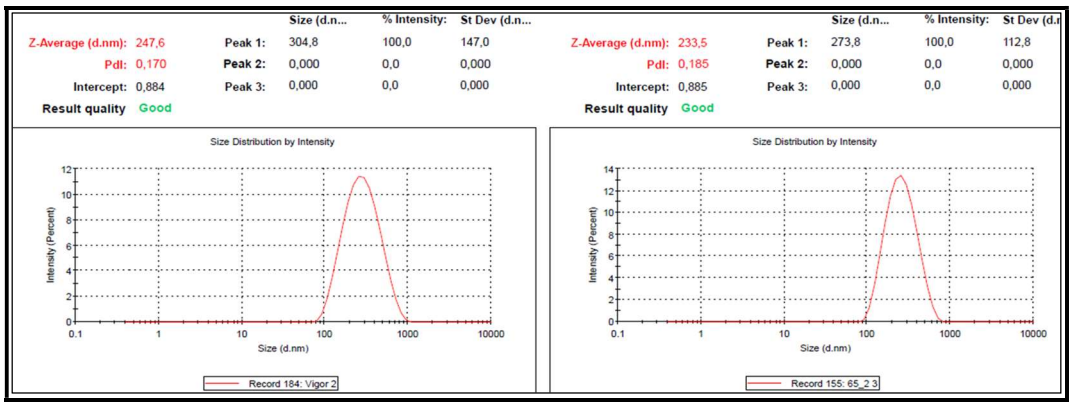


Figura 3-39 Comparativo del tamaño medio de partícula de Leche sin tratamiento (A) y tratada 218 W y 6 min (B)

3.1.15 Efecto del Ultrasonido sobre la hidrofobicidad superficial (Ho)

La H_0 es muy importante en la estabilidad, conformación y función de las proteínas, los cambios están muy relacionados con las interacciones proteína-proteína y proteína-agua (Arzeni, 2014; Kong & Yu, 2007a). En la Tabla 3.3.5 se muestran los

resultados de la hidrofobicidad superficial de la leche tratada bajo diferentes condiciones de potencia y tiempo, la H_o aumentó en la leche en todas las condiciones de tratamiento con valores que difieren estadísticamente entre ellos y con el blanco (Tabla 3.3-5).

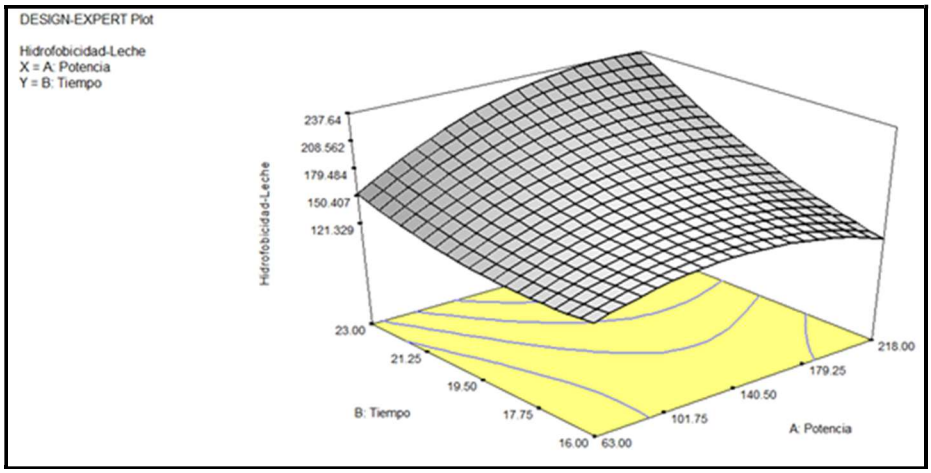


Figura 3-40 Superficie de respuesta para hidrofobicidad de la leche UP

Para los tratamientos de 141 y 173 W que se realizaron a 3 tiempos de tratamiento se nota que la hidrofobicidad aumenta con relación al blanco en el tiempo más bajo (2 y 1 min), para luego descender con un tratamiento de 10 minutos, este comportamiento sugiere que el tratamiento de ultrasonido indujo un despliegue de las moléculas de proteína, exponiendo los grupos y regiones hidrófobas dentro de la moléculas capaces de reaccionar con la sonda fluorescente (ANS o PRODAM) a un entorno circundante más polar. Este comportamiento también se ve en la Figura 3-40, que representa la de superficie de respuesta (Alizadeh-Pasdar et al., 2000).

Tabla 3.3-5 Resultados de hidrofobicidad superficial de muestras tratadas por ultrasonido

Tratamiento	*ANS*	*Prodam*
Blanco	86±0,83a	93±0,51a
128-6	117±0,41b	203±0,76b
141-2	148±0,53c	176±0,41c
141-9	114±0,47b	132±0,79d
173-1	255±0,89f	155±0,71d
173-6	172±0,66d	138±0,71d
173-10	106±0,57e	106±0,63f
205-2	154±0,89g	96±0,96a
205-9	142±0,60h	52±0,89g
218-6	125±0,51i	66±0,87i

Valores marcados con letras diferentes en una misma columna indican que tienen una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0{,}05$)

El despliegue de las proteínas inducidas por las fuerzas de cizallamiento de la cavitación acústica expone los sitios hidrofóbicos seguidos de la agregación de las proteínas desplegadas en la sonicación prolongada lo que disminuye la hidrofobicidad superficial. Shanmugam et al., (2012) reportaron un aumento inicial de la hidrofobicidad de la superficie en los concentrados de proteína de suero de leche durante los 5 minutos posteriores a la sonicación, seguida de una reducción con tiempos de sonicación más prolongados de hasta 60 minutos.

El pH se midió para controlar los cambios en el equilibrio mineral y para evaluar la posibilidad de agregación inducida por minerales. Sin embargo, los resultados en la tabla 3.3-6, no mostraron cambios significativos en el pH. Esto sugiere que las fuerzas de cizallamiento generadas por la sonicación no afectaron la transferencia de masa de minerales de las micelas de caseína, estos datos son concordantes con lo obtenido por (Balthazar et al., 2018).

Tabla 3.3-6 Comportamiento del pH en muestras tratadas por ultrasonido

Tratamiento	*pH*
Blanco	7.06±0,1[a]
128-6	7.06±0,2[a]
141-2	7.12±0,2[a]
141-9	7.65±0,3[b]
173-1	7.122±0,1[a]
173-6	7,42±0,1[b]
173-10	7.07±0,2[a]
205-2	7.12±0,1[a]
205-9	7.27±0,1[b]
218-6	7.24±0,1[b]

Valores marcados con letras diferentes en una misma columna indican que tienen una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0{,}05$)

3.1.16 Efecto del Ultrasonido sobre la estructura secundaria por FTMIR

Sueros

Los espectros FTMIR obtenidos de los sueros derivados de la coagulación de las muestras sometidas a ultrasonido a las distintas condiciones evidencian un cambio

en la estructura secundaria de las proteínas, mucho más fuerte que en el caso de la alta presión.

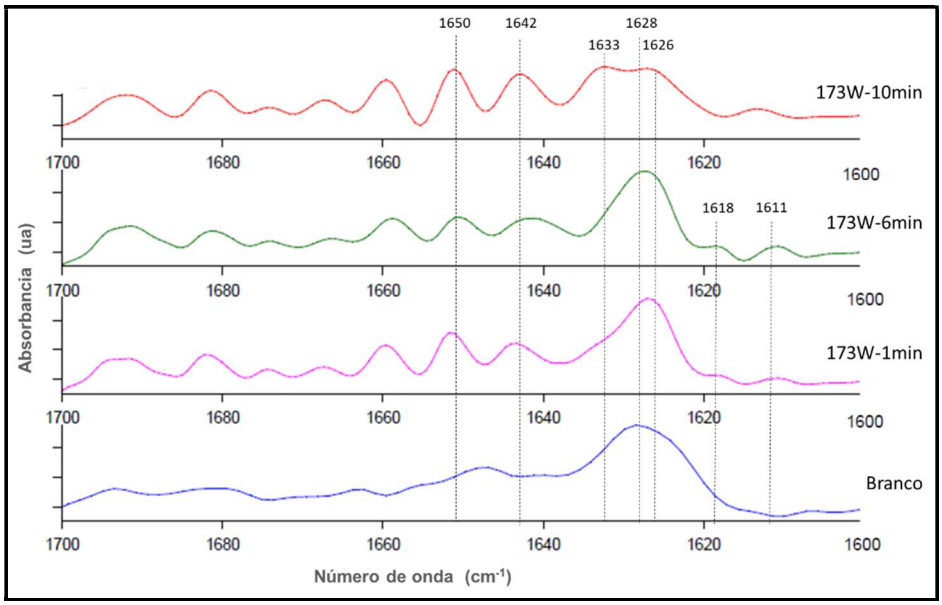


Figura 3-41 Segunda derivada de los espectros de suero dializado: blanco (azul) 173 W - 1min (violeta); ,173 W - 6min (verde) y 173 W - 10min (rojo)

La Figura 3-41presenta las segundas derivadas de los espectros de las muestras sometidas a la misma potencia (173 W) durante tiempos crecientes (1, 6 y 10 min) y resume de forma genérica el comportamiento de todas las muestras. El aumento del tiempo de tratamiento tiene como resultado un aumento de los tipos conformacionales y a tiempos altos (todas las muestras de 9 y 10 min de tratamiento) muestran un desdoblamiento de la banda de 1628 cm^{-1} en 1626 y 1633 cm^{-1}.

La Figura 3-42 ilustra el efecto del aumento de la potencia del tratamiento. Si comparamos las derivadas de las muestras tratadas a 218 W y 173 W durante 6 minutos es posible verificar que el efecto es obviamente mayor en la muestra tratada a mayor potencia, pero es menor que el efecto en una muestra tratada durante 10 minutos, aunque a potencia menor.

El blanco presenta un máximo a 1628 cm^{-1} el cual corresponde a estructuras de lámina β. Esta banda comienza a desdoblarse en picos a más alta y menor frecuencia 1633 y 1626 cm^{-1}). Se observa el aparecimiento de picos a ~1618 cm^{-1} y ~1611 cm^{-1}. Estos picos se originan en la formación de agregados a través de la organización intermolecular de lámina β, en el tratamiento a 173 W durante 10 minutos estas dos bandas desaparecen y aparece una a número de onda intermedio.

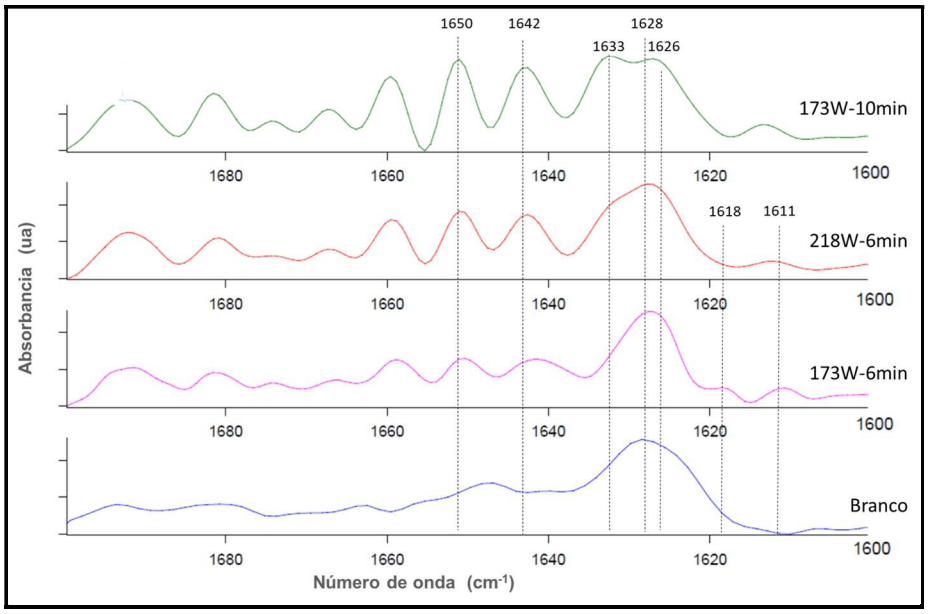


Figura 3-42 Segunda derivada de los espectros de suero dializado: blanco (azul) 173 W - 6min (violeta); 218-6min (rojo) y 173 W - 10min (verde)

Es claro que la intensidad de las bandas alrededor de 1630 disminuye cuando se comparan con la banda de ~1650 cm^{-1} atribuida a una estructura de bobina aleatoria. (Glassford et al., 2013). La aparición de una banda a 1640 cm^{-1} ha sido asociado a una 3_{10}-hélice, la cual es considerada una conformación que se forma durante las modificaciones de las α-hélices (Fonseca et al., 2012; Lefèvre & Subirade, 1999). El aumento de la intensidad de las bandas a 1680 cm^{-1} es atribuible a la formación de cadenas agregadas de lámina β anti paralelas y sugiere agregados recién formados (Fonseca et al., 2012).

Las bandas amplias generalmente indican una estructura más flexible y / o un aumento en el número de sub conformaciones diferentes. Por lo tanto, este efecto puede deberse al despliegue de proteínas en una estructura de bobina aleatoria más extensa. Los cambios en la estructura secundaria de la proteína sugieren que la forma dimérica de β-Lg se disocia, seguida por la creación de nuevas conformaciones con estructuras plegadas definidas que consisten en láminas β y bobinas aleatorias (Lefèvre & Subirade, 1999).

3.1.17 Efecto del Ultrasonido sobre la microestructura SEM

En la Figura 3-43 se muestran las microestructuras de los quesos producidos con leche no tratada y tratadas con ultrasonido. Las imágenes de SEM se obtuvieron a 1500 aumentos. Las imágenes muestran que los quesos de leche tratada con ultrasonido exhiben estructuras de gránulos más pequeños y fragmentos irregulares en

comparación con los de leche no tratada. La muestra B (tratada con ultrasonido) se ve más fina, pero más heterogénea, lo que sugiere que la exposición a una potencia ultrasónica alta podría generar estructuras desagregadas; esto puede ser causado por el despliegue de las proteínas y el aumento de superficie hidrofóbica. Esto se puede atribuir a micro chorros y turbulencia asociados a la cavitación, que logran alterar los enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas responsables de asociación intermolecular de proteínas (Gülseren et al., 2007; Liu et al., 2014; Zhao et al., 2014).

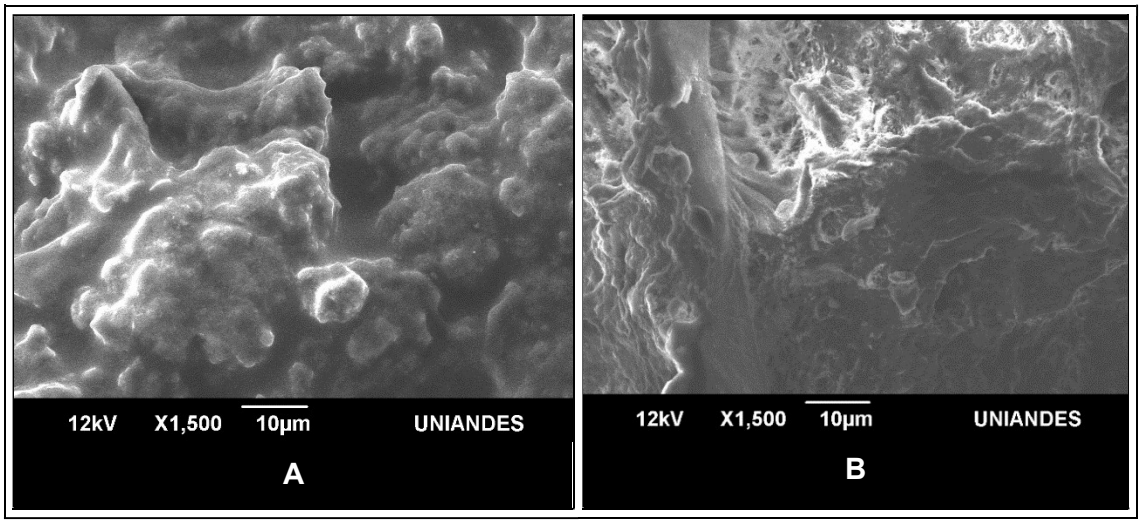


Figura 3-43 (A) Microestructura de queso producido con leche pasteurizada, Blanco; (B) Microestructura de queso con leche tratada a 173 W - 10min

Además hay una disminución significativa en tamaño de los agregados por el fraccionamiento de proteínas (Jambrak et al., 2014; Monteiro et al., 2018; Zhao et al., 2014)(Jambrak et al., 2014; Silva et al., 2018) y un cambio de la estructura proteica como respuesta a las fuerzas de cizalla producidas por el ultrasonido que cambia la hidrofobicidad superficial y la estructura secundaria y terciaria como fue discutido ya en otros apartes (Chandrapala, Zisu, et al., 2012).

3.1.18 Discusión y Conclusiones

Los resultados de este estudio muestran que el tratamiento HHP de la leche aumentó el rendimiento quesero, afectó el contenido de humedad de la cuajada y redujo el contenido de proteína del suero de leche. Los aumentos inducidos por HHP en el rendimiento de la cuajada fueron debidos a la incorporación de proteínas de suero desnaturalizadas en la cuajada, al aumento de incorporación de grasa y al aumento considerable de la retención de suero en la matriz del queso. La presión muestra un

efecto significativo sobre el rendimiento quesero ($p < 0{,}0018$), la humedad ($p < 0{,}0094$) y la sinéresis ($p < 0{,}0256$).

Para los tratamientos de ultrasonido, los resultados mostraron que el mayor rendimiento quesero se obtuvo a una potencia de 218 W y a un tiempo de sonicación de 6 minutos. A estas mismas condiciones se presentaron los mayores resultados de humedad y sinéresis con respecto a la muestra sin el tratamiento de ultrasonido. Probablemente el aumento del rendimiento se debe atribuir a que las fuerzas de cizalla producidas por el ultrasonido, provocan cambios en las micelas agregadas modificando las uniones fosfocálcicas y puentes disulfuro entre las paracaseínas afectando la formación de redes proteicas que aumentan la retención de agua dentro del queso, lo que se ve reflejado en el aumento del peso en el coagulo. Estadísticamente, la potencia fue la variable que presentó un efecto significativo sobre el rendimiento quesero ($p < 0{,}0068$), la humedad ($p < 0{,}0054$) y la sinéresis ($p < 0{,}0056$). En todos los experimentos se obtuvieron valores de rendimiento quesero, humedad y sinéresis superiores a los presentados por la muestra control.

El contenido de nitrógeno del suero de la leche tratada con HHP disminuye progresivamente con el aumento de la presión de tratamiento a partir de 400 MPa, lo mismo sucede con las muestras tratadas por ultrasonido, alcanzando la máxima reducción a la mayor potencia del tratamiento. El mecanismo de disminución del nitrógeno en el suero parece ser el mismo para las dos tecnologías evaluadas, este correspondería en ambos casos a un proceso de desnaturalización de las proteínas solubles que se acoplan a las caseínas y precipitan en la cuajada en mayor proporción que los cambios por la solubilización de caseínas o la presencia de caseinomacropéptido (CMP) derivado de la coagulación enzimática, ya que logran alterar los enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas responsables de asociación intermolecular de proteínas que cambia la hidrofobicidad superficial y la estructura secundaria y terciaria. En el proceso de coagulación, el caseinomacropéptido pasa a ser constituyente del suero, pero, por otra parte, las proteínas desnaturalizadas el suero pasan a hacer parte de las proteínas en la cuajada, por lo tanto, el contenido de nitrógeno tanto en la cuajada como en el suero reflejan en promedio estos dos fenómenos.

El análisis estadístico del fenómeno de adsorción indica una diferencia significativa tanto para el valor del agua ligada en la mono capa, como para los parámetros C y K del modelo de GAB en todas las muestra evaluadas, el contenido de agua en la mono capa aumenta con el aumento de la presión y el tiempo del tratamiento Por otra parte, el valor de la mono capa puede estar sobreestimado debido a procesos

como la solubilización de la lactosa que representa una proporción muy importante de los sólidos secos de la leche. Los bajos valores de energía del calor isostérico indican que el aumento en la hidratación de las proteínas responde más a un fenómeno de sorción física por la mayor área superficial de las micelas desagregadas en partículas más pequeñas, que a una interacción real con la superficie de la proteína.

Con respecto al tamaño de partícula, el tratamiento HHP a presiones 200 MPa 15 min, muestra un fenómeno de agregación con un aumento en el tamaño medio hasta 356 nm, debido a que estas presiones intermedias (entre 250 y 300 MPa) se favorecen las interacciones hidrofóbicas respecto a la solvatación de los residuos hidrofóbicos expuestos. La asociación se vería promovida, además, por la neutralización de las cargas negativas de las caseínas que producen los iones calcio disueltos. La presencia partículas más pequeñas de caseína se produce en la leche tratada a 600 MPa aparece como un nuevo pico de distribución en tamaños inferiores a 100nm. En el caso de las muestras tratadas por ultrasonido el efecto sobre el tamaño de partícula es menor, solamente alcanza diferencias del orden del 12%, la reducción en el tamaño de las proteínas se atribuyó a las fuerzas de cizallamiento hidrodinámicas asociadas con las cavitaciones ultrasónicas, sin embargo, no hay diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos, pero si con el blanco.

La formación de sitios hidrófobos en la superficie de las micelas de caseína como consecuencia de la aplicación de alta presión o del ultrasonido, se verifica a través de la tasa de unión de la sonda fluorescente reflejado en el aumento de absorbancia máxima y en el aumento de la pendiente (H_0) Para los tratamientos de 141 y 173 W que se realizaron a 3 tiempos de tratamiento se nota que la hidrofobicidad aumenta con relación al blanco en el tiempo más bajo (2 y 1 min), para luego descender con un tratamiento de 10 minutos, este comportamiento sugiere que el tratamiento de ultrasonido indujo un despliegue de las moléculas de proteína, exponiendo los grupos y regiones hidrófobas dentro de la moléculas capaces de reaccionar con la sonda fluorescente (ANS o PRODAM) a un entorno circundante más polar (Alizadeh-Pasdar & Li-Chan, 2000) El despliegue de las proteínas inducidas por las fuerzas de cizallamiento de la cavitación acústica expone los sitios hidrofóbicos seguidos de la agregación de las proteínas desplegadas en la sonicación prolongada lo que disminuye la hidrofobicidad superficial.

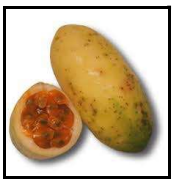
La desnaturalización inducida por HHP o ultrasonido de α-La o β-Lg fue evidente en el análisis de MIR de las muestras sometidas a tratamiento, especialmente en los espectros de los sueros dializados. El análisis infrarrojo muestra una disminución de la cantidad de lámina-β y α-hélice, indicando la desnaturalización de las proteínas del

suero , que aumenta con el nivel de presión o potencia aplicado durante los tratamientos, se observa la formación de agregados a través entrecruzamiento de la lámina β intermolecular, hay un aumento de la estructura lámina β anti paralela que sugiriere que los agregados recién formados consisten en láminas β, además hay un aumento en la estructura de bobina aleatoria debido al despliegue de proteínas en una bobina aleatoria de estructura más extensa, haciendo que se hidrate cada vez más, debido al rompimiento de los puentes de hidrógeno intramoleculares que forman interacciones intermoleculares entre el agua y los nuevos residuos de aminoácidos expuestos. Estas interacciones tienen consecuencias tecnológicas directas como el aumento en el rendimiento quesero y cambios en la textura de los productos de la coagulación.

El tratamiento de HHP o ultrasonido, provoca la desintegración de las micelas de caseína, así como la desnaturalización de las proteínas de suero. Durante la reorganización de las micelas se forman polímeros auto agregados, con un rango de tamaño menor a las micelas nativas lo que después de la coagulación da lugar a estructuras más cerrada en los geles de cuajo. Este es un resultado directo de un Incremento en el número de partículas proteicas y del número de posibles sitios de agregación. Los cambios causados a la leche por la aplicación de las tecnologías en estudio, conducen a una matriz proteica más uniforme. Las imágenes de SEM muestran que los quesos de leche tratada exhiben estructuras de gránulos más pequeños y fragmentos irregulares en comparación con los de leche no tratada.

La presión óptima para alcanzar propiedades deseables en la formulación de sistemas de proteínas coagulados está entre 300 y 400 MPa, ya que presiones inferiores no provocan casi ningún efecto en las proteínas y presiones superiores ocasionan desnaturalización profunda que dificultan la formación de coágulos estables que permitan ser moldeados y mantengan su forma y la retención de líquidos en su interior. Respecto al tratamiento por ultrasonido, la máxima potencia recomendada es 173 W con un tiempo de tratamiento máximo de 6 minutos, ya que es la que permite mejorar el rendimiento quesero y genera estructuras adecuadas en cuanto a las propiedades texturales, potencias y tiempos superiores ocasionan la formación de geles inestables, que se desmoronan fácilmente y tienen alta tendencia a la sinéresis.

CAPÍTULO 4-Desarrollo de producto fermentado



Curubas (*Pasiflora mollissima*)

4 Desarrollo de Productos a partir de proteínas lácteas modificadas

4.1.1 Introducción

Las altas presiones hidrostáticas (HHP) tienen una gran influencia en las propiedades físico-químicas y tecnológicas de la leche y se puede utilizar como una herramienta para desarrollar nuevos productos lácteos.

Este trabajo evaluó los efectos de la presión (200-600 MPa) y el tiempo de procesamiento (10-20 min) sobre las propiedades de las proteínas de la leche y su efecto sobre la calidad de un producto lácteo del tipo queso *Petit-Suisse* saborizado con pulpa de Curuba (*Passiflora mollissima*), con nuevas propiedades nutricionales y sensoriales y mayor vida útil.

La leche se sometió a tratamiento de alta presión y luego a fermentación con un cultivo comercial de *Lactococcus lactis, Lactococcus cremoris, Lactococcus dyacetilactis y Streptococcus termophilus*, durante 6 horas a 30 ° C y finalmente se añadió renina microbiana para promover la coagulación, manteniendo a 20 ° C durante 24 horas. El suero se separó y el coagulo se mezcló con crema de leche pasteurizada con un contenido de grasa del 20% con pulpa de fruta pasteurizada y azúcar en cantidades variables según un diseño basado en teoría de mezcla para maximizar la respuesta sensorial.

El producto terminado se empacó en porciones de 60 gramos y se mantuvo refrigerado a 4ºC durante 40 días. Se evaluaron además la cinética de fermentación y el comportamiento reológico del producto bajo los tratamientos. Se midió la variación de la acidez en la etapa de fermentación respecto al tiempo y los datos recogidos se ajustaron a una función de Weibull, determinando parámetros que se pueden relacionar con la acidez en equilibrio, la tasa de fermentación y el inverso de la velocidad inicial de fermentación.

En el caso del comportamiento reológico, se recogieron datos experimentales de esfuerzo cortante contra tiempo a una velocidad de deformación constante (100 s^{1}), y se ajustaron al modelo reológico de Weltmann, obteniéndose parámetros que se relacionan con el índice de fluencia y la velocidad de los daños estructurales.

Al producto terminado, con la formulación optimizada preparada a partir de leche tratada bajo las mejores condiciones arrojadas por el estudio, se trató por alta presión a 400 MPa por 4 minutos para reducir la post acidificación según lo reportado por Tanaca & Hatanaka (1992).

Se determinó la vida útil, mediante la evaluación de la cinética de reacción de las propiedades fisicoquímicas, pH y acidez expresada como porcentaje de ácido láctico y

de la aceptabilidad sensorial expresada como el porcentaje de calificaciones mayores o iguales a 4 en una escala hedónica de 5 puntos, a temperaturas de almacenamiento de 4 °C, 15 °C, 25 °C durante 40 días, se determinó el orden de reacción, la constante cinética de degradación del atributo y la energía de activación.

4.1.2 Efecto del pretratamiento con HHP

Para aplicar el tratamiento se usó leche descremada con un contenido de grasa del 0,5% que se mantuvo almacenada a 4°C hasta la aplicación de altas presiones hidrostáticas en las condiciones de presión y tiempo indicadas en el diseño experimental que se describe en la Tabla 4.2-1.

Una vez que la leche ha recibido el tratamiento de alta presión, la temperatura de la leche se ajustó a 37°C para hacer la adición de los fermentos *Lactococcus lactis, Lactococcus cremoris, Lactococcus dyacetilactis y Streptococcus termophilus*, ya que esta es la temperatura óptima de crecimiento. Para preparar el cultivo microbiano, se realiza un inóculo con 200 mL de leche estéril y 0,037 g de cultivo starter génesis® CM2 con una concentración de 1x10^9 UFC/g a 37°C y en agitación a 50 rpm. Luego de alcanzar un pH de 6,2 se añade en una proporción de 2% del iniciador por cada lote de fermentación de 1 L.

Tabla 4.2-1 Diseño experimental para proceso de fermentación

Variables codificadas		*Variables naturales*	
X_1	X_2	*P(MPa)*	*t(min)*
		Blanco sin tratamiento	
-1	0	200	10
-1	1	200	20
0	-1.414	400	8
0	0	400	15
0	1.414	400	22
1	-1	600	10
1.414	0	600	15
1	1	600	20

La fermentación se llevó a cabo durante 4 horas tomando muestras cada 10 minutos para determinar el pH y la acidez expresada como ácido láctico en g/L y entonces se adiciona renina de origen microbiano (Coalho líquido Britex®) en proporción del 0,1% para completar la etapa correspondiente a la coagulación a 37°C durante 20 horas. Una vez finalizada la coagulación, se procede a cortar la cuajada para facilitar el desuerado, el coagulo se reserva almacenado a 4°C para realizar las medidas de acidez final, reológia y textura.

4.1.3 Cinética de Fermentación:

Para el seguimiento de la acidez se usa el método descrito por la AOAC 947.05, 1990. Se empleó NaOH en una solución 0.01 N, como indicador de acidez se utiliza Fenolftaleína al 0.5% en etanol al 95%. Se tomaron muestras de 10 mL cada 15 minutos durante el tiempo de fermentación establecido, haciendo titulación por triplicado.

Los datos cinéticos de la acidez se ajustaron a la función tipo Weibull, (ecuación 4.2-1-1) para conseguir una descripción adecuada de procesos de fermentación con lactosa como sustrato, y su conversión en ácido láctico, asumiendo que la producción de este ácido está asociada con el crecimiento microbiano.

Ecuación 1.1.1-1

$$\frac{Y(t) - Ye}{Yo - Ye} = exp^{-\left(\frac{t}{\alpha}\right)^{\beta}}$$

Los parámetros del modelo de Weibull fueron estimados por mínimos cuadrados, un método no lineal, resuelto usando el software Scidavis® (Versión 0.2.4).

Ye se considera como un parámetro adicional en el modelo de Weibull. En la Tabla 4.2-2 se muestra el resumen de los parámetros del modelo ajustado (α, β y Ye), a partir de los datos experimentales de la fermentación.

Los resultados muestran que el efecto del tratamiento estimula la producción de ácido láctico, este efecto ha sido reportado para leches reconstituidas tratadas con presión, en donde la gelificación inducida por la acidificación se produce a valores de pH superiores que la producida en leches no presurizadas, debido a los cambios inducidos por la presión en la capacidad tamponadora y el equilibrio mineral (Harte, Luedecke, Swanson, & Barbosa Cánovas, 2003; Penna et al., 2007).

Además, en leche bovina presurizada, la acidificación producida por la inoculación con bacterias acido-lácteas se produce más rápidamente, probablemente debido a que la rotura de la micela produce un aumento del nitrógeno accesible a la bacteria acidoláctica, además, los cambios producidos en la estructura de las proteínas y las interacciones de estas con los demás componentes de la leche pueden estar involucrados en este fenómeno (Harte et al., 2003).

Tabla 4.2-2 Parámetros del modelo de Weibull

P(MPa)	*t(min)*	α*(min)*	β	*Ye(g/L)*
Blanco		141,6±3,09[a]	3,0±0,09a	5,8±0,07a
200	10	155,7±5,1[b]	2,8±0,12b	6,4±0,07b
200	20	146,7±5,9[c]	3,1±0,08a	6,1±0,09c
400	8	142,4±2,4[c]	2,8±0,18b	6,1±0,06c
400	15	141,6±4,1[c]	2,6±0,08c	6,2±0,09c
400	22	141,5±28,4[c]	2,5±0,09c	6,3±0,06d
600	10	138,9±4,5[d]	2,5±0,15c	6,4±0,06e
600	15	136,1±4,8[d]	2,5±0,23c	6,4±0,05e
600	20	123,1±2,45[e]	2,3±0,12d	6,9±0,08f

Letras diferentes en la misma columna indican diferencia estadísticamente significativa $(p < 0{,}05)$

El análisis estadístico de los datos experimentales indica que α, β y Ye evaluados dentro del diseño de experimentos se ven afectados en mayor medida por la interacción de las dos variables (presión y tiempo). La mayor concentración de ácido láctico en el equilibrio (6.968 g/L) se obtiene a una presión de 600 MPa cuando se aplica por 20 minutos, mientras en el control la acidez de equilibrio alcanzada es de 5.837 g/L. Por su parte los valores más bajos de α significa que la tasa de fermentación será más rápida, lo cual se obtiene cuando se aplica una presión de 600 en 20 minutos de tratamiento, lo que da un tiempo total de fermentación de 123.50 min contra 141.612 min para el control (Penna et al., 2007).

Los datos experimentales ajustan muy bien al modelo de Weibull con un R^2 de 0,99, en la Figura 4-1 se puede observar este ajuste.

Cuando se evalúa el comportamiento de Ye en relación a las variables Presión y Tiempo se encuentra que la producción de ácido láctico tiene una dependencia positiva y estadísticamente significativa por la presión $(p = 0{,}02)$, pero no con el tiempo de tratamiento $(p = 0{,}2)$,

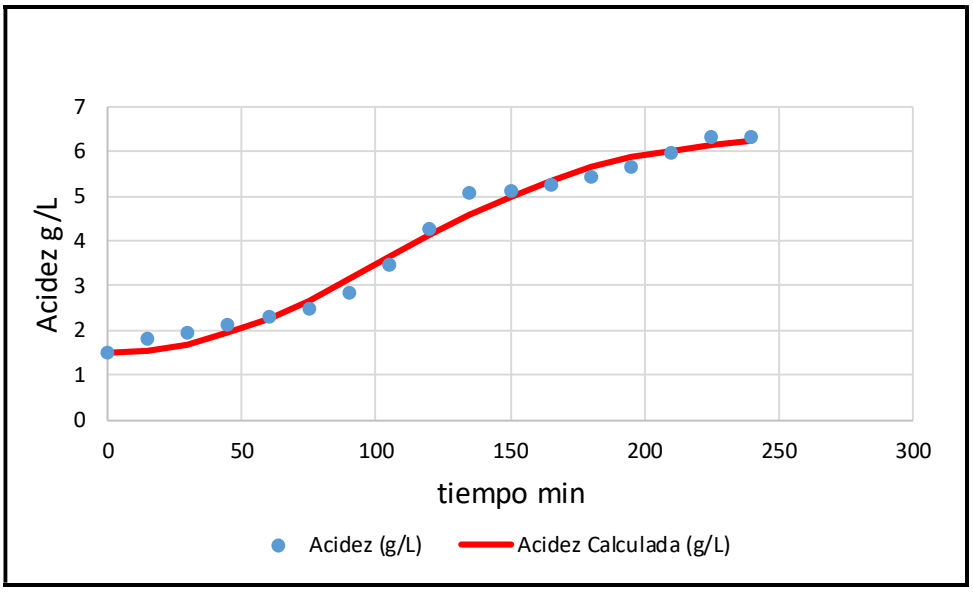


Figura 4-1 Modelo de distribución de Weibull. Puntos: Datos Experimentales, Línea continua: Datos ajustados al modelo. Condiciones 200 MPa 20 min

La Ecuación muestra el polinomio ajustado para la predicción de las condiciones que maximicen la producción de ácido láctico.

Ecuación 1.1.1-2

$$Ye = 6{,}46 + 0{,}11x1 + 0{,}003x2 - 0{,}076x1x2 + 0{,}11x1^2 + 0{,}22x2^2$$

El factor β relaciona el inverso de la velocidad inicial, los valores más bajos de β indica una velocidad inicial de fermentación más rápida, cuando se aplica una presión de 600 MPa en 20 minutos se observa un valor de β de 2.3, y cuando no hay tratamiento la velocidad inicial de fermentación es de 3.0.

Para poder analizar la relación entre presión y tiempo sobre las variables de respuesta, se realizó un análisis de varianza (Anexo estadístico), que da un ajuste al modelo polinómico $(p = 0{,}0049)$, y una relación estadísticamente significativa entre la interacción de las variables de proceso sobre la variable de respuesta β.

Para el parámetro α se realizó el análisis de varianza, encontrando una pérdida de ajuste de los datos experimentales al modelo polinómico y un coeficiente de correlación $R^2 < 0{,}48$, lo que no permite predecir el comportamiento de α en función de la presión y tiempo, estadísticamente de observa que no hay diferencia significativa $(p = 0{,}415)$ con la interacción de las variables independientes dentro del modelo polinómico.

El modelado del comportamiento a través de la superficie de respuesta para la producción de ácido láctico se puede ver en la Figura 4-2.

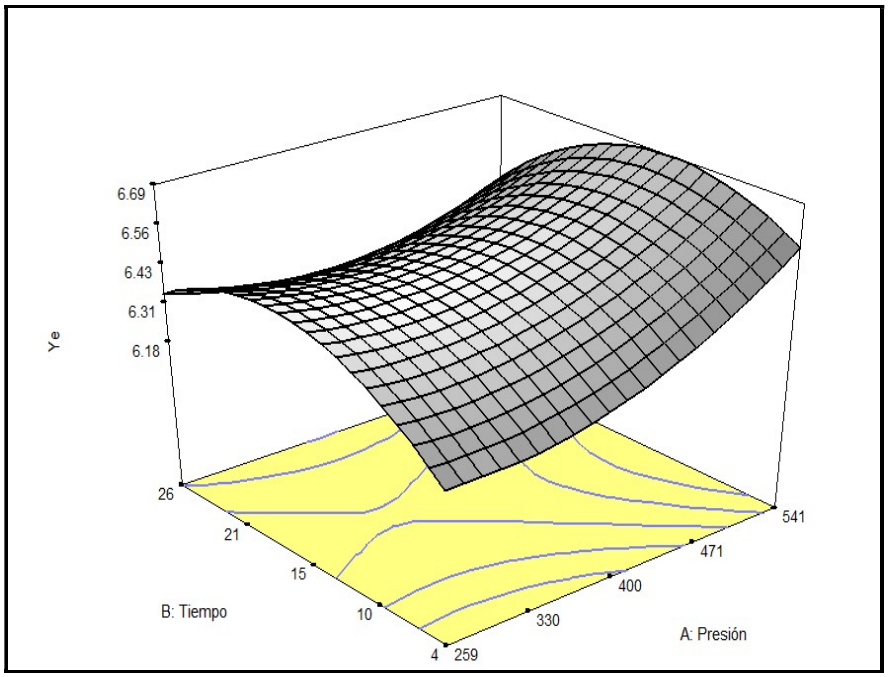


Figura 4-2 Superficie de respuesta de la producción de ácido láctico

4.1.4 Comportamiento reológico

De acuerdo con la literatura, los lácteos fermentados exhiben un comportamiento reológico dependiente del tiempo y entonces para explicarlo es necesario ajustar un modelo de comportamiento tixotrópico, para este caso se eligió el modelo de Weltmann (Ferry, 1980).

Se llevaron a cabo pruebas reológicas mediante la medición del esfuerzo cortante en función del tiempo a una velocidad de deformación constante de 100 s-1 (100 RPM) y 25°C, colectando 151 puntos, para lo cual se empleó un viscosímetro digital de cono y placa de Brookfield® (Modelo DV-II+ PRO para viscosidades medias). Estas curvas fueron ajustadas al modelo de Weltmann que describe el comportamiento reológico en función del tiempo.

Ecuación 1.1.1-1

$$\tau = A - B * \ln t$$

Donde τ indica el esfuerzo cortante (N/m^2) en el tiempo, A se asocia con el índice de fluencia (N/m^2), y B sobre la velocidad de los daños estructurales (N.s/m^2) cuando el fluido se somete a una velocidad de cizallamiento (Rojas-Castro et al., 2007). Valores bajos de A indica menor fluidez de la muestra, es decir mayor consistencia.(Alvarez, 2008; Penna et al., 2007) Las muestras correspondientes al tratamiento de 200 MPa tienen un comportamiento similar a la muestra control, mientras que las muestras tratadas a 400 MPa muestras un comportamiento más firme. Los resultados muestran

que el coeficiente A (índice de fluencia), se ve afectado de forma directa por las variables de experimentación. La Tabla 4.2-3 muestra los valores de los parámetros del modelo reológico para las muestras tratadas por alta presión comparadas con el control.

Tabla 4.2-3 Parámetros del modelo de Weltmann

P(MPa)	t(min)	A (N/m^2)	B ($N.S/m^2$)
Blanco		6,4±0,7[a]	-0,82±0,3a
200	10	6,5±0,8[a]	-1,2±0,4db
200	20	6,6±0,7[a]	-1,5±0,3b
400	8	6,7±0,6[a]	-1,9±0,3c
400	15	8,0±0,6[b]	-1,2±0,3b
400	22	5,5±0,8[c]	-0,8±0,6a
600	10	10,1±0,7[d]	-2,9±0,6e
600	15	10,5±0,6[d]	-2,8±0,3e
600	20	7,3±0,6[e]	-2,3±0,4d

Letras diferentes en la misma columna indican diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$)

La muestra más consistente (5,52 N/m^2) se obtiene cuando se aplica una potencia de 400 MPa en un tiempo de 22 minutos, mientras que para la muestra control el índice de fluencia es 6,4 N/m^2. Para el parámetro B se obtienen valores negativos, cuando B es negativo indica una disminución de la tensión al aumento de la velocidad de cizallamiento, es decir que la sustancia tiene un comportamiento tixotrópico (Gutierrez-Mendez et al., 2013).

En el proceso de fermentación y conformación del coagulo ácido como primera etapa en la fabricación del queso tipo *Petit Suisse*, el tratamiento con HHP de la leche antes de la fermentación promueve la desnaturalización de las proteínas del suero (principalmente β-Lg y α-La) y su interacción a través de enlaces disulfuro con κ-caseína en la superficie de la micela de caseína. El efecto de recubrimiento de las proteínas de suero en la superficie de las micelas evita la coalescencia de las micelas cuando la fermentación disminuye el pH hasta el punto isoeléctrico de la caseína y por lo tanto favorece la estructura tridimensional de coagulo con la retención del suero (Harte et al., 2003).

El tratamiento de alta presión previo a la acidificación de la leche desde su pH natural hasta un cercano a pH 4,6 resulta en un gel que tiene mayor firmeza que cuando se utiliza leche sin tratamiento, además, el tratamiento de la leche reduce la liberación

de suero (sinéresis) en el fermentado. Estos efectos se atribuyen a la asociación de las proteínas del suero desnaturalizadas con las micelas de caseína tal como se ha reportado en el capítulo 3 y en otros trabajos en la producción de yogurt (Harte et al., 2003; Penna et al., 2007; Rojas-Castro et al., 2007).

En la Figura 4-3 se observan 4 diferentes muestras correspondientes al diseño experimental. El uso del pretratamiento con alta presión hidrostática asegura una extensa desnaturalización de las proteínas del suero y la ruptura de la micela de caseína, respectivamente. La reagregación de las submicelas se produce durante la fermentación, el efecto del tratamiento de HHP mejora el comportamiento reológico del coagulo ácido. Las muestras tratadas a 600 MPa, presentan un desempeño más pobre, con una estructura más frágil, si se comparan con las muestras tratadas a 400MPa. Que corresponden en la Figura 4-3 a la curva más alta.

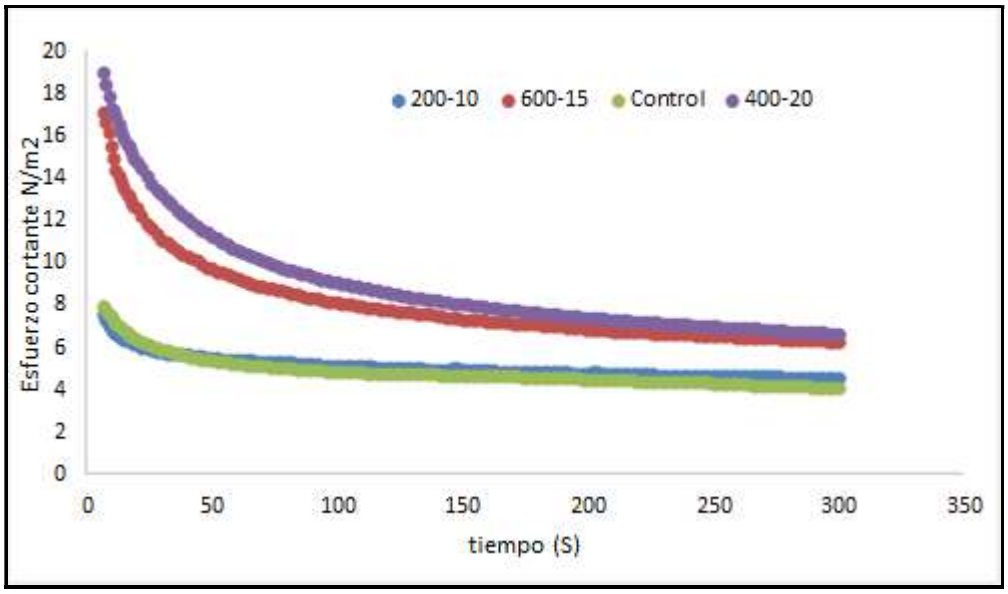


Figura 4-3 Comparativo del comportamiento reológico del blanco y tres tratamientos.

En la Figura 4-4 se muestra el ajuste de los datos experimentales al modelo de Weltmann y se puede concluir que el comportamiento de las muestras en estudio es tixotrópico, es decir que la viscosidad depende del tiempo. También se puede observar el alto coeficiente de correlación (R^2 = 0,99) de los datos experimentales ajustados al modelo.

Los tratamientos con alta presión también favorecen la coagulación ácida, factores como la desintegración de la micela la pérdida de la estabilidad electroestática de la micela de caseína influyen en la calidad del coágulo formado por acidificación (Zobrist et al., 2005).

Además de otros factores como la misma cinética de fermentación pueden afectar las propiedades físicas del coágulo ácido, son las proteínas y sus interacciones las que conducen a valores mayores de viscosidad, las interacciones entre las proteínas del suero y las caseínas por las interacciones hidrofóbicas y electrostáticas y los enlaces covalentes tiol / disulfuro presentes en la red de gel son responsables del aumento de la firmeza del coagulo ácido (Penna et al., 2007).

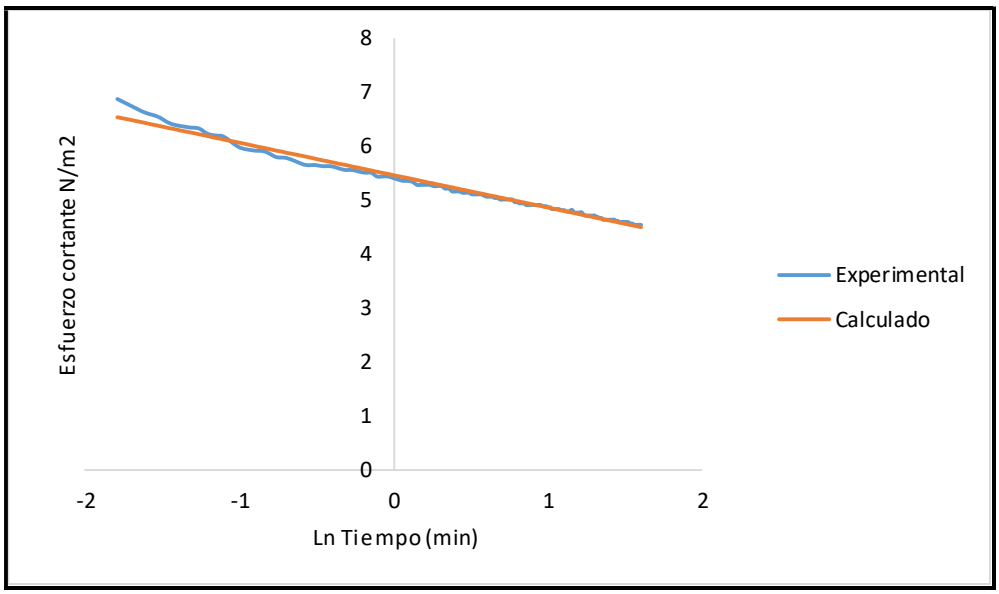


Figura 4-4 Modelo de Weltmann Curva azul: datos experimentales. Curva roja Esfuerzo Cortante ajustado al modelo de Weltmann.

Las diferencias en la textura solo pueden deberse a las diferencias en las interacciones de las proteínas, promovidas por la variación de la presión, uno de los efectos principales de la presión sobre los componentes es la modificación de la estructura y la funcionalidad de la proteína, La aplicación de presiones superiores a 400MPa, provocan desnaturalización profunda de las proteínas y afectan seriamente las interacciones proteína-proteína, dando como resultado productos de menor consistencia.

El parámetro B se relaciona con el grado de tixotropía, es decir que este se asocia a un cambio en la tasa de pérdida de estructura del sistema. Valores bajos de B indica menor velocidad en la que el sistema tiene daños en su estructura, la menor velocidad de cambio (0,86 N.S /m^2 se obtiene cuando se aplica una presión de 400MPa en 22 minutos de tratamiento, mientras que la velocidad de cambio para una muestra sin tratamiento es de 0,82 (N.s) /m^2).

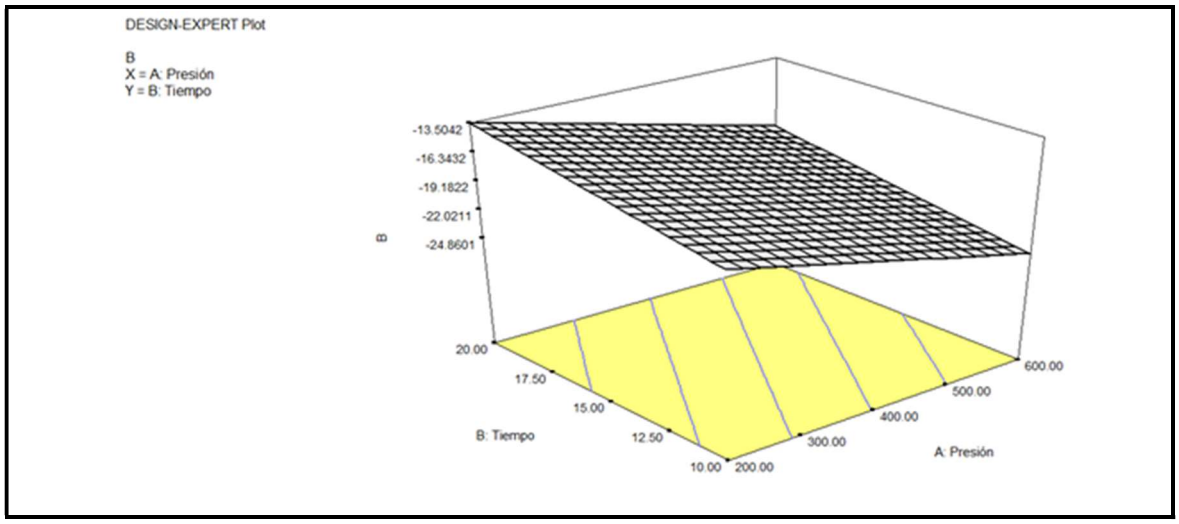


Figura 4-5 Superficie de respuesta para el parámetro B del modelo de textura de Weltmann

El análisis estadístico ANOVA sobre el parámetro B, indica que no hay diferencia significativa $(p = 0{,}0534)$. Sin embargo, el modelo polinómico de las interacciones de variables (presión y tiempo) es la que más afecta al parámetro B, siendo la presión estadísticamente significativa $(p = 0{,}0279)$.

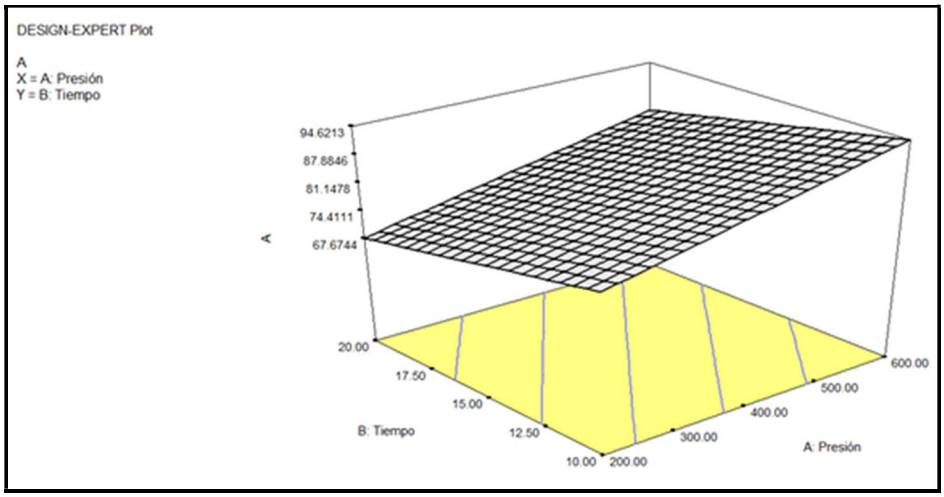


Figura 4-6 Superficie de respuesta para el parámetro A del modelo de textura de Weltmann

Para el parámetro A se encuentra una diferencia significativa $(p = 0{,}040)$ dentro de las variables evaluadas, la presión $(p = 0{,}018)$ y la interacción de presión y tiempo $(p = 0{,}032)$ tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la consistencia del producto.

Los resultados muestran que la aplicación de presión produce una modificación estructural en la proteína, a lo cual puede ser atribuido al efecto que tiene en su índice

de fluidez, que causa un efecto positivo en la viscosidad del producto si se compara con la muestra control. Algunos estudios demuestran que las propiedades de los geles formados por acidificación mejoran al presurizar la leche (Harte et al., 2003; López-Fandiño, 2006; Penna et al., 2007).

La agregación de pequeñas partículas en la micela da lugar a agregados compactos de menor tamaño cuando se alcanza el punto isoeléctrico. Además, el hecho de que en su superficie se encuentre β-Lg desnaturalizada contribuye a la firmeza del gel y a la resistencia a la sinéresis. Se ha observado que la firmeza de los yogures elaborados a partir de leche presurizada aumenta a medida que aumenta la presión (Harte et al., 2003).

Algunos estudios han encontrado que el uso de un tratamiento térmico (85ºC, 30 min), antes o después de los tratamientos de alta presión, produce una amplia desnaturalización de las proteínas de suero, mejora las propiedades reológicas y reduce la sinéresis. A este respecto debe indicarse que algunos estudios han puesto de manifiesto que la firmeza optima se obtiene combinando la desnaturalización de las proteínas de suero con una alta concentración de micelas de caseínas disgregadas (Harte et al., 2003).

4.1.5 Diseño de formulaciones

Con base en los resultados obtenidos en la fase de fermentación, se escogió como mejor condición el tratamiento de 400 MPa y 22 min y a esta condición se fabricó un coagulo acidificado como base para el desarrollo.

Para completar la segunda etapa del desarrollo del queso tipo *Petit suisse*, se aplicó la metodología de superficie de respuesta en triángulo de mezcla, reduciendo la formulación a tres compontes, Coagulo (Componente A) en un rango de 76-82g/100 g de mezcla y está constituido por 88% de cuajada y 12% de crema de leche pasteurizada con un contenido graso del 20%; Azúcar (Componente B) en un rango de 6-12g/100g de mezcla y Fruta (Componente C) constituido por pulpa de Curuba (*Passiflora mollissima*) de 13°Brix, pasteurizada a 70°C por 20 min en un rango de 12-18g/100 g de mezcla.

La suma de todos los componentes que integran la mezcla debe ser 100%, esto significa que los componentes no pueden ser manipulados independientemente unos de otros, y que sus proporciones deben variar entre 0 y 1 (Montogomery, 2004; Ortega-pérez et al., 2015).

Las formulaciones definidas por el diseño experimental se elaboraron por la mezcla de los componentes y se someten a tratamiento de alta presión a 400 MPa por 4 minutos para reducir la pos acidificación del producto y buscar ampliar la vida útil.

El análisis del modelo de mezcla arroja una ecuación de optimización en la cual los parámetros del modelo se estiman utilizando el método de mínimos cuadrados y el modelo se elige en función de la cantidad de puntos experimentales, la prueba de falta de ajuste y el resumen de estadísticos (Ortega-pérez et al., 2015). Una vez se obtiene el modelo de optimización, se resuelve usando la herramienta Solver®, para predecir la formulación que maximiza la respuesta sensorial.

En la Tabla 4.3-1 se pueden ver las distintas formulaciones propuestas y la proporción de mezcla de los componentes para completar la región experimental, cada formulación se preparó por triplicado.

Tabla 4.3-1 Proporciones de componentes para el triángulo de mezcla

Queso	*Azucar*	*Fruta*
82	6	12
79	9	12
76	12	12
79	6	15
76	12	13
77	10	13
76	6	18
77	7	16
78	8	14
82	6	13
76	9	15
80	7	13

4.1.6 Evaluación de formulaciones

Como variable de respuesta se escogió la aceptación sensorial, dado que en el desarrollo de productos es precisamente la aceptación sensorial el factor que permite tomar las decisiones de ajuste para satisfacer las expectativas de los consumidores potenciales.

Para este estudio se emplea un panel de consumidores habituales del producto, con edades entre los 17 y 25 años, para la selección se consideró el gusto por el producto y la disponibilidad para participar en las sesiones de evaluación. Al tratarse de un panel de consumidores y no de un panel entrenado, se realiza primero un entrenamiento acerca de la forma de abordar una prueba afectiva.

La prueba consiste en responder a una escala hedónica de 5 puntos, acerca de aspectos del producto, Color, Aroma, Sabor; Textura, Dulzor y Aceptación general, evaluados en ese orden sobre muestras codificadas, entregadas en cada sesión. Los promedios ponderados de la calificación de cada característica se alimentan a la matriz de evaluación de mezclas en el software Desing Expert®

Para obtener el dato de aceptación general los datos recogidos de las pruebas sensoriales se agruparon por frecuencias en cada uno de los valores de la escala: 5 Me gusta mucho; 4 Me gusta moderadamente; 3 Ni me gusta ni me disgusta;2 me disgusta moderadamente; 1 Me disgusta mucho, la expresión porcentual corresponde a la suma de las frecuencias en las calificaciones 4 y 5 dividido por el número total de pruebas. Los promedios ponderados de la calificación de cada característica se alimentaron a la matriz de evaluación para graficar el perfil. Los datos recogidos de 41 panelistas escogidos de un grupo de consumidores de queso tipo *Petit Suisse* se tabularon y analizaron en un formato de frecuencia de cada uno de los atributos consultados.

Tabla 4.3-2 Muestra de cálculo de los datos obtenidos de un panel de evaluación.

Código 79-9-12-1												
Color		*Aroma*		*Sabor*		*Textura*		*Dulzor*		*Aceptación general*	
Nota	*Frecuencia*	*Nota*	*Frecuencia*	*Nota*	*Frecuencia*	*Nota*	*Frecuencia*	*Nota*	*Frecuencia*	*Nota*	*Frecuencia*
5	21	5	22	5	22	5	15	5	25	5	25
4	9	4	12	4	15	4	15	4	12	4	10
3	11	3	7	3	4	3	11	3	4	3	6
2		2		2	0	2	0	2	0	2	0
1		1		1		1	0	1		1	
Promedio	41		41		41		41		41		41
ponderado	**4,2**		**4,4**		**4,4**		**4,1**		**4,5**		**4,5**

En la Tabla 4.3-2 se ve a modo de ejemplo el manejo de los datos obtenidos en panel con escala hedónica de 5 puntos. El primer número del código de la muestra representa la cantidad de queso, el segundo la cantidad de azúcar, el tercer la cantidad de fruta y el ultimo es el número de orden del experimento.

El perfil sensorial del producto da una idea grafica del comportamiento de los atributos, en la Figura 4-7 se puede ver el perfil del producto de mejor calificación sensorial, código 79-9-12 y de calificación más baja código 76-6-15.

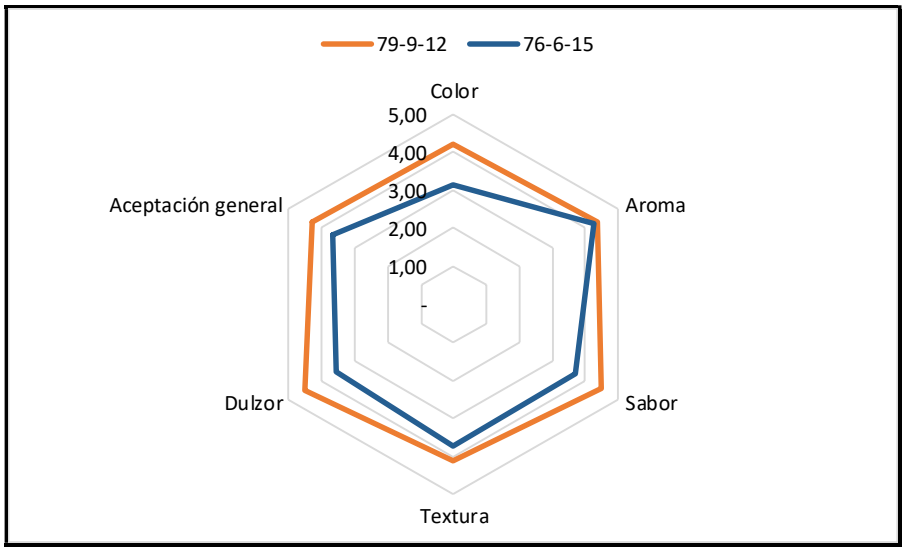


Figura 4-7 Perfil sensorial de dos muestras evaluadas por el panel, Formula 79-9-12 color naranja y 76-6-15 color azul.

En el perfil sensorial se puede ver que la mayor distancia en la calificación se encuentra en los atributos de sabor y sensación del sabor dulce, lo que muestra que es el azúcar y no solamente el contenido de fruta lo que condiciona la respuesta del sabor y la aceptación sensorial, respecto al aroma la respuesta sensorial es equivalente, lo que indica que el nivel de fruta en la formula condiciona esta respuesta.

En la Tabla 4.3-3 se pueden ver los resultados por atributo de las muestras evaluadas, se aplica un análisis estadístico de Anova para entender la contribución de cada uno de los ingredientes en la percepción sensorial, cada atributo se analiza independientemente, pero para la optimización se considera la aceptación general como el parámetro a maximizar.

La evaluación estadística individual de cada uno de los atributos, se expresa como una superficie de respuesta y genera la ecuación de optimización correspondiente, mediante la cual se puede calcular la formulación que maximiza el atributo, así como el componente y combinación de componentes que tienen un efecto estadísticamente significativo.

Tabla 4.3-3 Resultados generales de la evaluación sensorial de quesos tipo *Petit Suisse*

Código	*Color*	*Aroma*	*Sabor*	*Textura*	*Dulzor*	*Aceptación general*
82-6-12	3,80	4,24	4,07	4,20	4,16	4,07
79-9-12	4,19	4,34	4,48	4,12	4,55	4,30
76-12-12	3,82	4,27	4,40	3,79	4,34	4,07
79-6-18	4,44	4,29	3,98	3,85	4,12	4,13
76-12-13	3,82	4,27	4,40	3,79	4,34	4,07
77-10-13	3,78	4,27	4,37	3,73	4,17	4,03
76-6-15	3,16	4,24	3,70	3,73	3,59	3,69
77-7-16	3,78	4,27	4,22	3,73	4,00	4,00
78--8-14	4,17	4,12	4,21	3,98	4,34	4,13
82-6-13	3,80	4,24	4,07	4,20	4,16	4,07
76-9-15	4,44	4,29	3,98	3,85	4,12	4,13
80-7-13	4,22	4,33	4,27	4,05	4,20	4,22

Cuando se analiza el color, las combinaciones AB, AC y BC tienen un efecto estadísticamente significativo $(p = 0{,}003;\ p = 0{,}001;\ p = 0{,}05)$., es decir la combinación de coágulo, la fruta y el azúcar afectan la percepción de color.

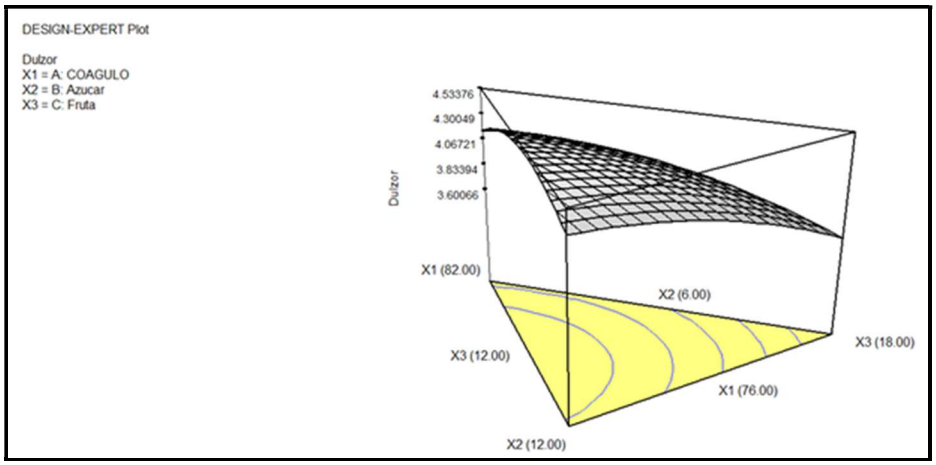


Figura 4-8 Superficie de respuesta para el color

$$Color = -0{,}8A - 27{,}3B - 18{,}9C + 0{,}39AB + 0{,}28AC - 0{,}029ABC$$

Dónde A es queso, B es azúcar y C es fruta.

Para el sabor es la combinación AB $(p = 0{,}013)$ la que tiene un efecto significativo, es decir que son el queso y el azúcar los que contribuyen al sabor, mientras que para el aroma es la interacción ABC $(p = 0{,}04)$ es decir que son los ingredientes en conjunto los que definen la respuesta sensorial del aroma.

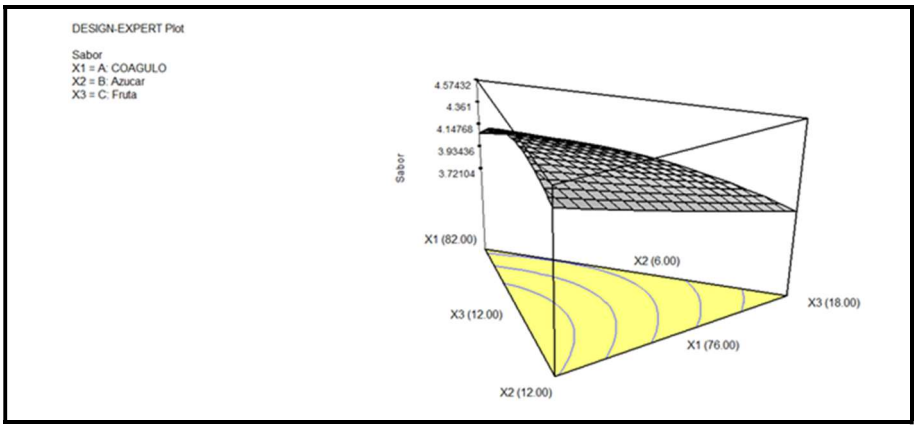


Figura 4-9 Superficie de respuesta para el sabor

$$Sabor = 0{,}05A - \ 1{,}7B + 1{,}188C + 0{,}28AB + \ 0019AC$$

Donde A es queso, B es azúcar y C es fruta

Para el aroma la mayor contribución como es de esperar esta en el contenido de la fruta, pero tambien afectan las combinación de azucar y fruta asi como de coagulo y fruta.

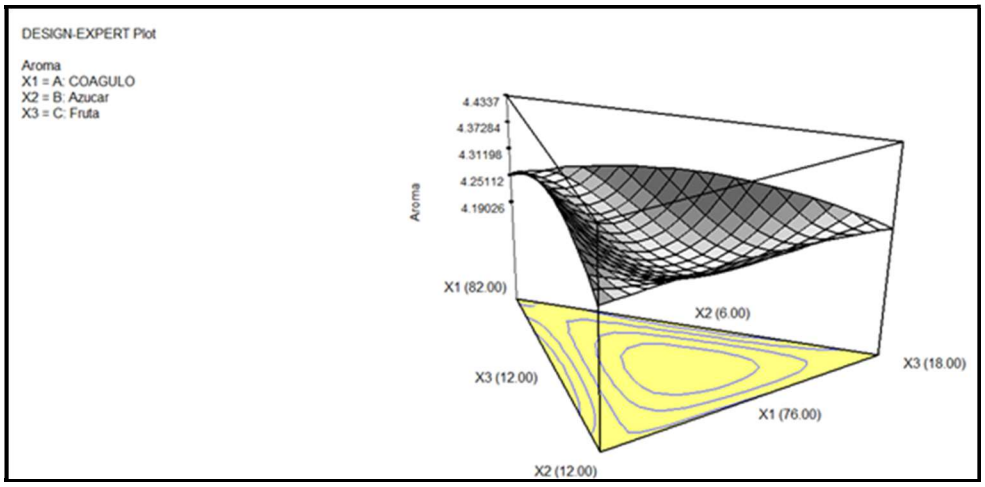


Figura 4-10 Superficie de respuesta para el aroma

$$Aroma = -0{,}29A + \ 15{,}6B + \ 7{,}46C + 0{,}22AB + \ 0{,}11AC + 1{,}33BC$$

Donde A es queso, B es azúcar y C es fruta

El componente principal responsable de la textura es el coagulo en la calificación de la textura, los componetes de azucar y pulpa contribuyen tal como se ve en la ecuación resultante, pero no es clara la contribución de las mezclas binarias por separado.

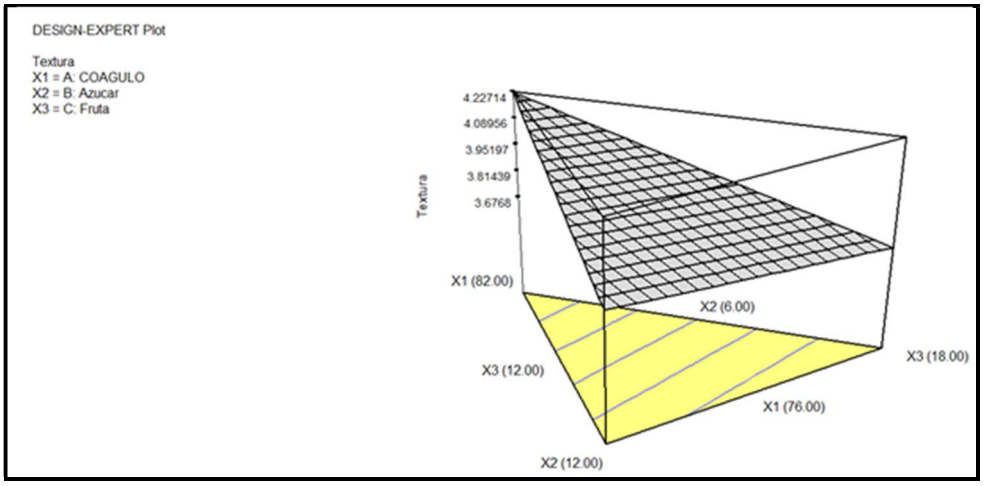


Figura 4-11 Superficie de respuesta para la textura

$$Textura = 5{,}72A + 1{,}2B + 3{,}3C$$

Donde A es queso, B es azúcar y C es fruta

La evaluación del parámetro de aceptación general arroja como resultado que es la combinación del coagulo (queso) y la fruta (C) $(valor\ p = 0{,}02)$ la que contribuyen de manera significativa con la respuesta sensorial.

La Figura 4-12 muestra la superficie de respuesta que modela el comportamiento del parámetro de aceptación con relación a la composición de la mezcla.

En la evaluación de la aceptación sensorial promedio se tiene que la combinación queso-fruta (AC) y queso – azúcar (AB) tiene un efecto estadísticamente significativo $(p = 0{,}007$ y $p = 0{,}001)$.

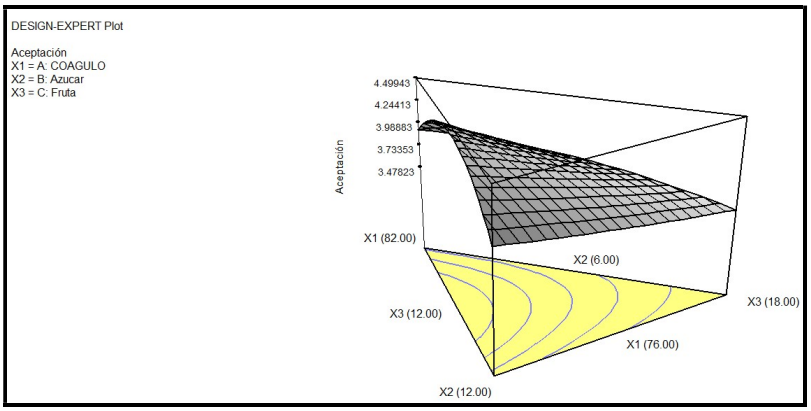


Figura 4-12 Superficie de respuesta para el atributo de aceptación general.

Los resultados generan una ecuación polinómica significativa con un R^2 de 0,728. La

Ecuación 1.1.1-1-1 muestra los coeficientes de optimización.

Ecuación 1.1.1-1

$$Aceptación = 3{,}9A + 3{,}88B + 3{,}48C + 2{,}04AB + 0{,}56AC - 0{,}088BC$$

Donde A es queso, B es azúcar y C es fruta

Al resolver la ecuación después de la interpretación de los resultados y en consideración al diseño del triángulo de mezcla, se selecciona como la formulación más idónea en cuanto a la aceptación sensorial, una combinación del 80% en peso de coagulo (conformado por el coagulo fermentado y la adición de crema de leche), un 10% de pulpa de fruta y un 10% de azúcar.

4.1.7 Determinación de la vida útil

Las muestras obtenidas con la mejor formulación y en las condiciones definidas por los ensayos de cinética de fermentación y comportamiento reológico, fueron tratadas a 400MPa por 4 minutos después de la fermentación, se almacenaron en tres condiciones de temperatura y se evaluaron en cuanto al valor de pH, acidez y aceptación sensorial global, comparadas con un blanco sin tratamiento después de la fermentación.

Se hizo seguimiento de pH, acidez expresada como porcentaje de ácido láctico y aceptación sensorial expresada como el porcentaje de calificaciones de los panelistas superiores a 4 en una escala hedónica de 5 puntos, los días 5,15 y 30 de almacenamiento. Una vez determinado el orden de reacción n y el valor de la constante cinética *k* se procedió a calcular el tiempo por sustitución de los términos en la ecuación general.

4.1.8 Análisis sensorial para determinar la vida útil

Selección de los panelistas

La capacidad de discriminación se mide a través de la aplicación de pruebas triangulares que consisten en presentar a cada panelista tres muestras de las cuales dos son iguales y una diferente, el panelista debe identificar la muestra diferente siendo estas presentadas en orden aleatorio. Para la selección del panelista se registran los resultados de acierto de 10 pruebas triangulares y se considera la prueba Chi-cuadrada (X^2) ajustada. La tabla 4.4-1 muestra los resultados individuales de los panelistas, resaltados se encuentran los que alcanzan el nivel de aceptación. Finalmente se

seleccionan 10 panelistas sobre los cuales se aplica el protocolo de entrenamiento para generar en el grupo consenso acerca de los estímulos sensoriales y su traducción a un lenguaje común. Además de la importancia de la consistencia en las respuestas y la seriedad de su trabajo (ICONTEC, 1998, 2013).

Tabla 4.4-1 Chi cuadrado (X^2) calculado para los panelistas

PANELISTA	*Total jucios*	*Aciertos*	*Fracasos*	*Chi-cuadrado*
1	10	5	5	7,97
2	10	5	5	7,97
3	10	6	4	7,82
4	10	8	2	7,52
5	10	10	0	7,22
6	10	4	6	8,12
7	10	6	4	7,82
8	10	8	2	7,52
9	10	8	2	7,52
10	10	9	1	7,37
11	10	6	4	7,82
12	10	5	5	7,97
13	10	7	3	7,67
14	10	8	2	7,52
15	10	4	6	8,12
16	10	5	5	7,97

Entrenamiento de los Panelistas

Para desarrollar una terminología descriptiva y entrenar a los panelistas, se llevaron a cabo pruebas sensoriales descriptivas sobre productos preparados bajo la formulación definida y procesados bajo las condiciones del estudio. La Tabla 4.4-2 recoge los descriptores del producto, el referente usado para el entrenamiento y la escala de percepción usada para calificar el producto a lo largo del tiempo.

Tabla 4.4-2 Descriptores del perfil sensorial de queso *Petit Suisse* saborizado con curuba (*Pasiflora mollissima*)

Descriptor	*Referente*	*Escala 5 puntos*
Brillo	Coagulo de leche fermentada	Ausente-muy intenso
Color curuba	Color caracteristico-Batido con leche 10% fruta	Ausente-muy intenso
Aroma curuba	Aroma caractristico-Pulpa de fruta	Ausente-muy intenso
Sabor dulce	Solución azucarada al 10% w/w	Ausente-muy intenso
Sabor Curuba	Sabor caracteristico-Batido con leche al 10% de fruta y 10% de azucar	Ausente-muy intenso
Sabor acido	Yogurth natural sin azucar	Ausente-muy intenso
Cremosidad	Petir suisse comercial-Alpinito®	Ausente-muy intenso
Firmeza	Petir suisse comercial-Alpinito®	Ausente-muy intenso
Arenosidad	Grumos apreciables-Yogurth griego-Alpina®	Ausente-muy intenso
Aceptación general		Me gusta mucho-Me disgusta

4.1.9 Cinética de degradación

Los resultados de cada uno de los parámetros evaluados se recogieron a lo largo del tiempo tanto para la muestra tratada como para la muestra control. Para los obtener los datos de evaluación sensorial, las muestras fueron presentadas a analistas sensoriales en una serie de no más de 3 muestras, codificadas con un número aleatorio y se pidió calificar de acuerdo con el color, sabor y olor, textura y aceptación general. Para la estimación se considera el promedio de la aceptación sensorial global y no los parámetros individuales, pues al tratarse de un panel semientrenado, la alta variabilidad de las respuestas dificulta el modelado.

Para los consumidores, el criterio sensorial es el más importante, lo que lo hace el más efectivo para confirmar la vida útil en modelos dinámicos como el que aquí se propone (Olivas, Nevárez, & Gastélum, 2009; Rosenthal, 1992).

La tabla recoge los datos obtenidos para los parámetros fisicoquímicos de pH y acidez y para el parámetro medido a través del panel sensorial de aceptación general.

Evidentemente la acidez y el pH no son los únicos parámetros de calidad que pueden describir la vida útil del producto, pero están directamente relacionados con la respuesta sensorial, ya que bajos valores de pH o altos tenores de acidez resultan en bajas calificaciones durante la evaluación sensorial.

Los parámetros de calidad del producto fermentado fueron dependientes del tiempo de exposición y la temperatura de almacenamiento. El valor de pH de las muestras varió de 4,45 para la muestra de control (0 días / 4 ° C) a 4,0 para la muestra que permaneció durante 40 días a 15°C ($p < 0{,}05$), lo que sugiere la aparición de una acidificación posterior, que es un parámetro relevante que influye en la viabilidad de las bacterias pro bióticas en productos lácteos fermentados, bajo temperaturas de refrigeración, principalmente. Adicionalmente, los resultados refuerzan que la tolerancia de las bacterias pro bióticas a bajos valores de pH (Penna et al., 2007).

Tabla 4.4-3 Parámetros fisicoquímicos de las muestras almacenadas

Muestras tratadas HHP					*Control*		
Día	*T°C*	*pH*	*% A.Láctico*	*% Aceptación*	*pH*	*% A.Láctico*	*% Aceptación*
0	4	4,3±0,05	0,7±0,01	96,6±0,7	4,4±0,5	0,6±0,011	98,0±0,7
0	4	4,4±0,04	0,7±0,09	98,0±0,6	4,5±0,2	0,7±0,01	96,6±0,1
0	4	4,2±0,06	0,6±0,03	95,3±0,4	4,3±0,08	0,5±0,01	97,0±0,09
5	4	4,2±0,08	0,7±0,02	82,6±0,1	4,3±0,03	0,6±0,03	97,6±0,10
5	15	4,2±0,05	0,7±0,05	81,3±0,03	4,1±0,03	0,6±0,05	86,6±0,11
5	25	4,1±0,03	0,8±0,06	66,6±0,7	4,4±0,10	0,7±0,01	65,6±0,12
15	4	4,0±0,09	0,7±0,03	81,3±0,3	4,4±0.11	0,8±0,07	80,6±0,03
15	15	4,1±0,05	0,7±0,06	78,6±0,7	3,9±0,12	0,7±0,08	77,0±0,14
15	25	3,9±0,02	0,8±0,07	22,6±0,6	3,8±0,08	0,8±0,01	20,6±0,15
30	4	4,1±0,14	0,7±0,05	72,6±0,16	3,9±0,14	0,9±0,02	65,0±0,06
30	15	4,0±0,05	0,8±0,02	46,6±0,07	3,8±0,08	1,0±0,02	46,6±0,17
30	25	3,9±0,01	1,1±0,12	20,6±0,18	4,0±0,16	1,1±0,02	12,3±0,08
40	4	4,0±0,07	0,8±0,02	75,6±0,09	3,8±0,07	1,0±0,02	62,3±0,09
40	15	4,0±0,08	0,9±0,04	40,6±0,20	3,7±0,18	1,1±0,04	36,1±0,80
40	25	3,8±0,09	1,2±0,05	4,0±0,21	3,6±0,06	1,3±0,02	2,6±0,21

La acidez aumenta y pH, descienden y en respuesta a ello, la apreciación sensorial de las dos muestras se deteriora hasta que se vuelve indeseable puntuación inferior a 60 puntos).

4.1.9.1 Efecto del tratamiento

Los resultados muestran en general puntuaciones positivas durante todo el tiempo de evaluación para las muestras con tratamiento almacenadas a 4°C, mientras que la muestra sin tratamiento empezó a bajar a los 15 días de almacenamiento, siendo inaceptable antes de los 30 días.

La muestra con tratamiento tiene una constante cinética $(k = 0{,}5877)$ mientras que la muestra sin tratamiento tiene una mayor constante cinética $(k = 0{,}77)$ mostrando en todo caso una mayor velocidad en el deterior de la aceptación sensorial y los demás parámetros evaluados en el estudio.

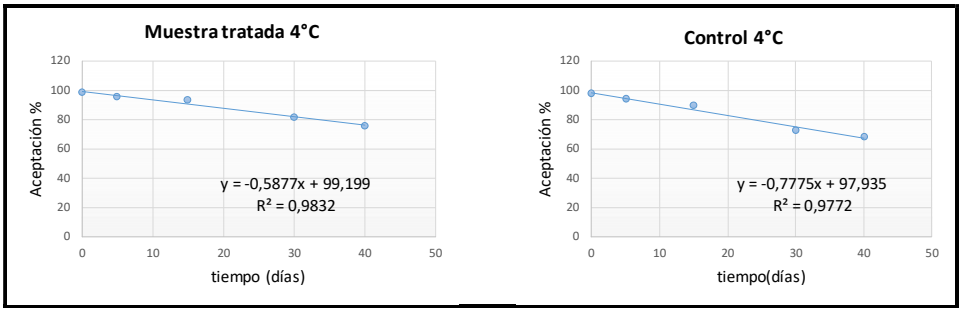


Figura 4-13 Deterioro de la aceptación sensorial de muestras almacenadas a 4°C

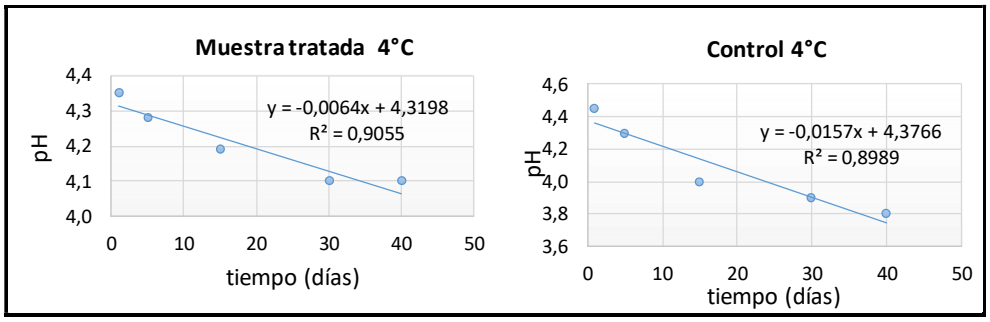


Figura 4-14 Deterior de los valores de pH de muestras almacenadas a 4°C

Como era de esperar, los parámetros de acidez y pH son dependientes del tiempo, y están afectados por la temperatura de almacenamiento. El valor de pH de las muestras varió de 4,45 a 3,8 para la muestra de control en 40 días de almacenamiento a 4°C, y para la muestra tratada de 4,45 a 4,10 en el mismo periodo, este cambio sugiere la ocurrencia de post-acidificación, que es un parámetro relevante en la viabilidad de los productos, y en muchos casos determinante de la aceptación sensorial (Vernaza et al., 2006)

Este fenómeno ha sido descrito por varios autores sobre productos lácteos fermentados, como el yogur. La "acidificación posterior a la producción" se define como una disminución en los valores de pH después de la fermentación y durante el almacenamiento a temperaturas de refrigeración (Hu et al., 2017)

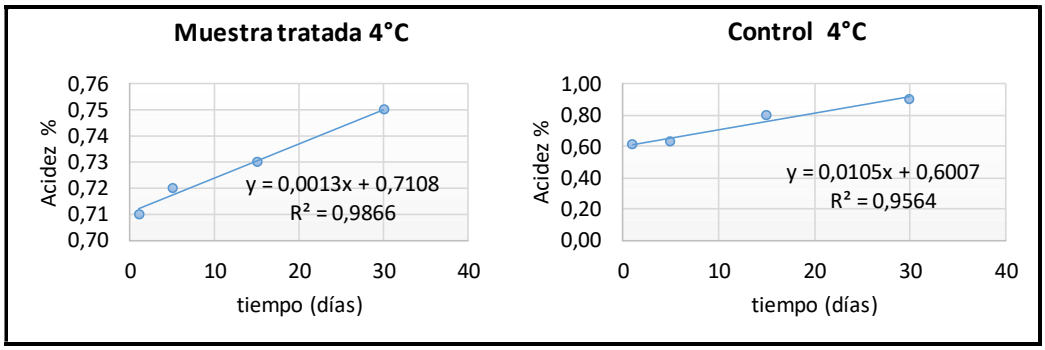


Figura 4-15 Evolución de los valores de acidez en muestras almacenadas a 4°C

4.1.9.2 Efecto de la Temperatura de almacenamiento

Durante el tiempo de almacenamiento, la acidez de las muestras aumento gradualmente, en todas las condiciones de almacenamiento, pero para la acidez, como para los otros parámetros evaluados, la tendencia de cambio es diferente y aumenta a temperaturas más altas de almacenamiento. Se puede concluir que la temperatura tiene influencia en los valores finales de acidez.

En particular el aumento de acidez de las muestras durante el almacenamiento mostró un comportamiento similar, indicando el ya mencionado proceso de pos acidificación por parte de las bacterias acido lácteas presentes en el producto, es de especial interés la resistencia de estas bacterias al tratamiento pos fermentación en las condiciones estudiadas (400 MPa 4 min), otros estudios han reportado también la supervivencia a la presión (Lopes et al., 2018).

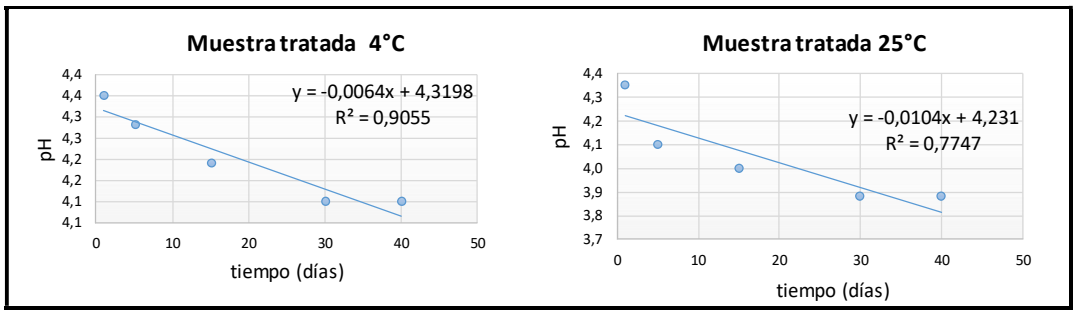


Figura 4-16 Evolución de los valores de pH de muestras almacenadas a 4 y 25°C

También se ha reportado por otros autores un comportamiento similar en yogurt con un aumento de la acidez con el aumento temperatura (> 10 ° C) (Harte et al., 2003; Vernaza et al., 2006; Zhi et al., 2017).

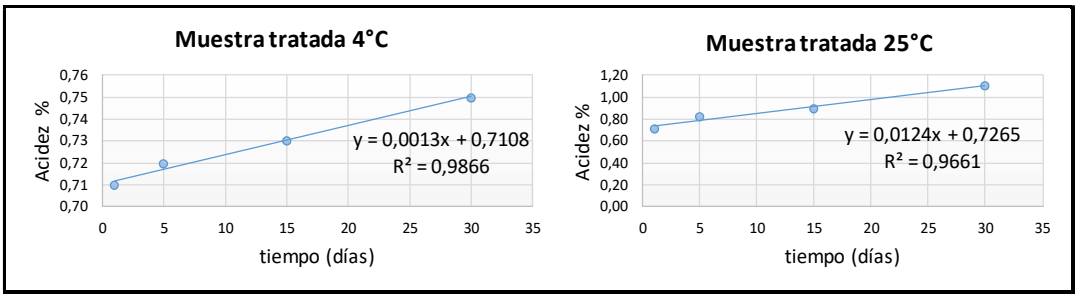


Figura 4-17 Evolución de los valores de acidez de muestras almacenadas a 4 y 25°C

El cambio en la velocidad de acidificación se refleja en las constantes cinéticas para el proceso a las dos temperaturas, la constante cinética aumenta en un orden de magnitud ($k4°C = 0{,}0013$ y $k25° = 0{,}012$)

Las muestras presentaron evidentes diferencias en la respuesta sensorial, en general las puntuaciones descienden durante el tiempo a todas las condiciones de almacenamiento, pero se observó que la evaluación las puntuaciones se mantuvieron positivas durante todo el período de almacenamiento a 4°C, mientras que con el aumento de las temperaturas (15 y 25°C), las puntuaciones empezaron a bajar más rápidamente llegando a ser inaceptables antes de los 10 días de almacenamiento a 25°C, si se considera como deseable que la calificación de más del 75 % de los evaluadores sea superior a 4 (Me gusta) en la escala hedónica de 5 puntos usada en este estudio. La baja calificación sensorial guarda una relación directa con el aumento de la acidez.

Los cambios respecto a la calificación sensorial por parte de los evaluadores sugieren sensibilidad de los consumidores al sabor ácido de los productos, que es el principal cambio sensorial observado en los fermentados, como resultado del aumento del metabolismo microbiano. Otros estudios han informado que la respuesta sensorial de productos lácteos pro bióticos es sensible a la temperatura de almacenamiento a lo largo de su vida útil, asociado a los fenómenos de pos acidificación (Cadena et al., 2010).

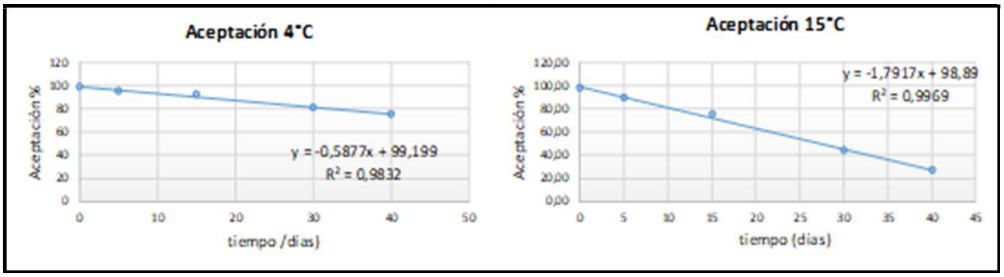


Figura 4-18 Deterioro de la aceptación sensorial de muestras almacenadas a 4 y 15°C

La velocidad de deterioro de la aceptación sensorial, prácticamente se triplica, pasando de *k = 0,58* a 4°C a *k = 1,79* para las muestras almacenadas a 15°C.

4.1.9.3 Determinación del orden de reacción

Los datos se grafican para cada uno de los modelos cinéticos con el fin de encontrar los valores de las constantes a cada temperatura. Las gráficas muestran los datos de aceptación y su evolución en el tiempo para una muestra tratada por alta presión y almacenada a 4°C, ajustados por regresión lineal, y con la ecuación de la recta, en donde la pendiente representa la constante cinética, para cada orden de reacción. El valor más alto del R^2 define el modelo que más se ajusta al comportamiento cinético de las variables en estudio.

Los resultados del ajuste a las cinéticas muestran valores más altos para la cinética de orden cero, regida por la ecuación:

$$Q = Qi + kt$$

Donde Q representa el atributo a modelar, en este caso el promedio de la aceptación sensorial y k la constante cinética de velocidad de cambio. Por lo tanto, para la predicción se vida útil se usa esta expresión matemática.

Las ecuaciones de regresión que se obtuvieron por la variación de la aceptación sensorial y fueron ajustados al modelo linearizado de cinéticas de orden cero, las ecuaciones resultantes y su grado de ajuste se muestran en la Tabla 4.4-4.

Tabla 4.4-4 Ecuaciones de regresión para la aceptación sensorial en cinética de orden cero

T°C	*Muestras HHP*	*Control*
4°C	y = -0,5841x + 98,47 R^2 = 0,994	y = -0,793x + 95,633 R^2 = 0,9853
15°C	y = -1,8485x + 101,66 R^2 = 0,9869	y = -1,9434x + 93,969 R^2 = 0,9917
25°C	y = -2,2254x + 91,903 R^2 = 0,996	y = -2,167x + 85,839 R^2 = 0,992

Para verificar el nivel de ajuste a los otros modelos cinéticos, los datos obtenidos de la aceptación sensorial se transformaron en el logaritmo natural de valor, las ecuaciones que se obtuvieron se expresan según el modelo correspondiente.

$$LnQ = LnQi - kt$$

Las ecuaciones y los valores de ajuste se describen en la tabla a continuación.

Tabla 4.4-5 Ecuaciones de regresión para la Aceptación sensorial en cinética de primer orden

T°C	Muestras HHP	Control
4°C	y = -0,0065x + 4,5916 R^2 = 0,978	y = -0,0104x + 4,5718 R^2 = 0,9775
15°C	y = -0,0257x + 4,6517 R^2 = 0,9479	y = -0,0324x + 4,5939 R^2 = 0,9492
25°C	y = -0,0426x + 4,5987 R^2 = 0,9733	y = -0,0498x + 4,5634 R^2 = 0,9732

Para verificar el ajuste a un modelo de según orden los datos de la aceptación sensorial se modificaron a 1/Aceptación sensorial, el modelo se rige por la siguiente ecuación, la tabla recoge estos resultados.

$$\frac{1}{Q} = \frac{1}{Qi} + kt$$

Tabla 4.4-6 Ecuaciones de regresión para la aceptación sensorial en cinética de segundo orden

T°C	*Muestras HHP*	*Control*
4°C	y = 7E-05x + 0,0101 R^2 = 0,955	y = 0,0001x + 0,0103 R^2 = 0,904
15°C	y = 0,0004x + 0,0089 R^2 = 0,9155	y = 0,0006x + 0,0088 R^2 = 0,9074
25°C	y = 0,0009x + 0,0077 R^2 = 0,9203	y = 0,0013x + 0,0067 R^2 = 0,9105

El grafico de la Figura 4-19 y la Tabla 4.4-7 ilustran la regresión para la aceptación sensorial y los datos de las constantes cinéticas de cada modelo para todos los parámetros evaluados. El ajuste de los datos tiene un mejor R^2 para un n = 0 es decir

para una cinética de orden cero, es por esta razón que para la predicción de la vida útil sensorial se toma esta como ecuación de predicción. En la Tabla 4.4-7 se pueden consultar las constantes cinéticas y los valores de ajuste de todos los parámetros evaluados, los cambios en el pH y la acidez, tiene un mejor ajuste a una cinética de primer orden, especialmente a la mayor temperatura de almacenamiento.

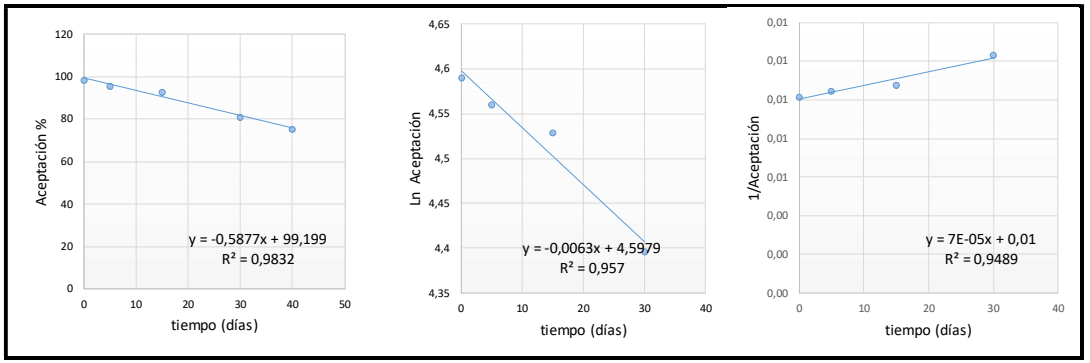


Figura 4-19 Grafica del comportamiento cinético de la aceptación sensorial ajustados a 3 órdenes de reacción.

Tabla 4.4-7 Valores de las constantes cinéticas y el ajuste

		Muestras tratadas por HHP 400 Mpa-4 min						*Control*					
T°C	***K***	***pH***	***R²***	***%Ácidez***	***R²***	***% Aceptación***	***R²***	***pH***	***R²***	***% Ácidez***	***R²***	***% Aceptación***	***R²***
4°C	K_1	-0,008	0,972	0,001	0,992	-0,588	0,983	-0,022	0,959	0,010	0,956	-0,778	0,977
	K_2	-0,002	0,975	0,002	0,991	-0,006	0,957	-0,005	0,966	0,014	0,943	-0,010	0,940
	K_3	0,001	0,977	0,002	0,990	0,000	0,940	0,001	0,973	-0,019	0,928	0,000	0,930
15°C	K_1	-0,112	0,983	0,003	0,941	-1,792	0,990	-0,023	0,896	0,013	0,994	-1,762	0,970
	K_2	-0,003	0,986	0,004	0,936	-0,026	0,970	-0,006	0,912	0,017	0,999	-0,028	0,960
	K_3	0,001	0,988	-0,006	0,931	0,000	0,930	0,001	0,973	-0,022	0,995	0,001	0,910
25°C	K_1	-0,015	0,793	0,012	0,912	-2,232	0,990	-0,024	0,892	0,016	0,982	-2,110	0,990
	K_2	-0,004	0,801	0,013	0,896	-0,043	0,950	-0,006	0,910	0,019	0,991	-0,047	0,950
	K_3	0,001	0,809	-0,014	0,869	0,001	0,890	0,002	0,926	-0,023	0,984	0,001	0,910

4.1.9.4 Determinación de la energía de activación

La temperatura tiene una gran influencia en la evolución de los parámetros fisicoquímicos y sensoriales en el tiempo, es por esto que es necesario establecer la relación entre las constantes cinéticas k y la temperatura, para modelar este fenómeno se emplea la ecuación de Arrhenius.

$$k = Ae^{-Ea/RT}$$

Para estimar los parámetros del modelo, los datos de *k* a las tres temperaturas se grafican como en Ln *k* versus 1/T donde T es la temperatura de almacenamiento en grados Kelvin. La grafica se ajusta por regresión y la pendiente de estas graficas representa Ea/R lo que permite establecer la energía de activación de la degradación de cada uno de los parámetros tanto fisicoquímicos como sensoriales; el intercepto representa el parámetro *A.*

La principal utilidad de la estimación de la energía de activación es que permite calcular los valores de las constantes cinética a cualquier temperatura y predecir la vida útil a otras condiciones de almacenamiento en el rango de temperaturas estudiado.

Mediante la expresión matemática:

$$\frac{\ln k2}{\ln k1} = \frac{Ea}{R}\left(\frac{1}{T2} * \frac{1}{T1}\right)$$

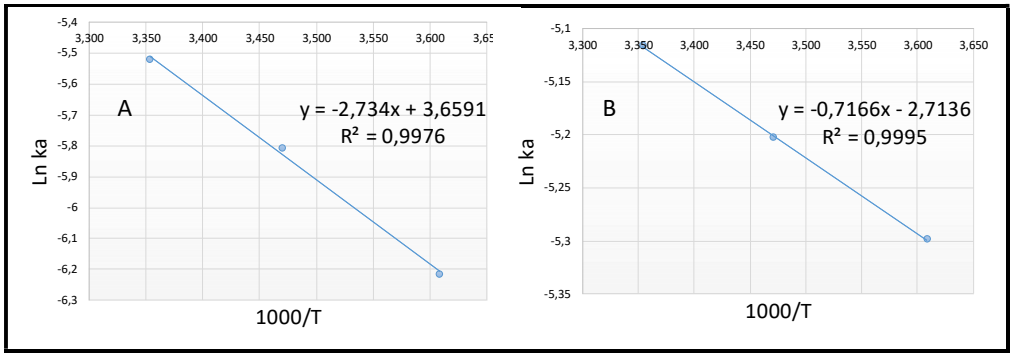


Figura 4-20 Grafico de Arrhenius para el pH; Muestra tratada HHP(A); Control (B)

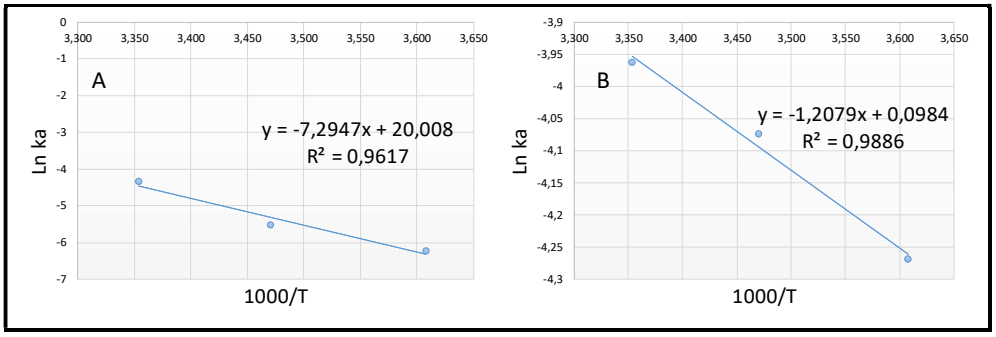


Figura 4-21 Grafico de Arrhenius para la acidez; Muestra tratada HHP(A); Control (B)

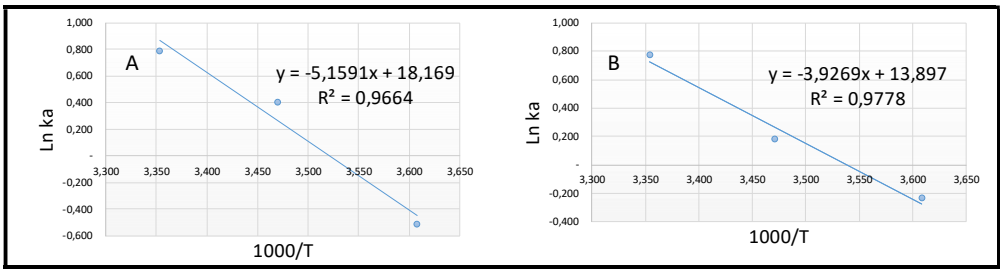


Figura 4-22 Grafico de Arrhenius para la aceptación sensorial; Muestra tratada HHP(A); Control (B)

Los gráficos ilustran las correlaciones para cada uno de los parámetros, la Tabla 4.4-8 recoge los datos calculados para la energía de activación. Los mayores valores de energía de activación para la muestra tratada por alta presión indican una menor susceptibilidad al deterioro en comparación con la muestra control.

Tabla 4.4-8 Energía de activación del deterioro de los atributos pH, acidez y aceptación sensorial.

	Muestra HHP		***Control***	
	Ea/R	***Ea (KJ/Mol)***	***Ea/R***	***Ea (KJ/Mol)***
pH	*2,734*	*329,00*	*0,716*	*86,16*
Acidez	*7,2947*	*877,82*	*1,2079*	*145,35*
% Aceptación	*5,1591*	*620,83*	*3,9269*	*472,55*

4.1.10 Calculo de la vida útil sensorial

El modelado de la cinética de reacción de la aceptabilidad tiene coeficientes de correlación altos para una cinética de orden cero, por lo tanto, se usó la ecuación de orden cero para la estimación de la vida útil sensorial (Phimolsiripol & Suppakul, 2016;

Zhi et al., 2017). Como criterio se usa la frecuencia acumulada de las calificaciones del panel sensorial, considerando como valor límite de aceptación una calificación de 4 (Me gusta). En la Tabla 4.4-9 se ve un ejemplo de la estimación de la aceptación genera, donde la calificación acumulada de Me gusta mucho y Me gusta, representan el 75% del total de los juicios.

Tabla 4.4-9 Ejemplo de cálculo de calificación global

	Nota	*Frecuencia*		*Frecuencia acumulada*
Me gusta mucho	5	1	8%	8%
Me gusta	4	8	67%	75%
Ni me gusta-Ni me disgusta	3	2	17%	92%
Me disgusta moderadamer	2	1	8%	100%
Me disgusta mucho	1	0	0	100%
Total Juicios		12		

Se considera como límites de rechazo el 25% debido a que, en metodologías de estimación de la vida útil sensorial tal como el análisis por estadística de supervivencia que emplean la aceptabilidad sensorial porcentual como variable respuesta de modelación, estos límites dependen de la perecibilidad del producto y deben orientarse a garantizar también la inocuidad microbiológica, que por razones prácticas no se incluyó en este estudio (Cruz et al., 2010; Curia et al., 2005). Es decir, se considera como valor aquel en el cual la calificación del panel sensorial seria del 75% de aceptación.

Tabla 4.4-10 Predicción de la vida útil sensorial

Muestra	*Parametro*	*Modelo de predicción*	*ka*	Q_i	*Valor final del parametro (Q)*	*Vida útil a 4°C /días*
Muestra tratada HHP	Aceptación sensorial	Q= -0,5841t+98,47	0,58	98,47	75	40
Muestra Control	Aceptación sensorial	Q= -0,793t+95,633	0,79	95,63	75	26

En estas condiciones se obtuvo una vida útil sensorial de aceptación del 75% de 40 días para el producto tratado después de la fermentación con HHP (400 MPa – 4 min) almacenado a 4°C y de 26 días para el producto control almacenado a la misma temperatura (Tabla 4.4-10). La vida útil más extendida del producto tratado por alta

presión en comparación con el producto sin tratamiento, indica que a pesar de que se ha reportado la supervivencia de una población importante de bacterias acido lácteas después del procesamiento a presiones inclusive superiores a 700 MPa, la capacidad de fermentación, y la resistencia al ambiente ácido se afecta (Tanaka & Hatanaka, 1992). Esto significa que el tratamiento posterior a la fermentación funciona como un método de conservación que permite mantener al producto fermentado en condiciones de aceptación sensorial por casi el doble de tiempo que un producto sin tratamiento.

4.1.11 Discusión y Conclusiones

Se desarrolló un queso de tipo *Petit Suisse* formulado a partir de un coagulo obtenido por fermentación acidoláctica de leche pre tratada con alta presión hidrostática, saborizado con fruta natural que exhibe propiedades texturales mejoradas, con muy baja sinéresis y con una vida de casi el doble de la de una muestra sin tratamiento de alta presión posterior a la fermentación.

La función tipo Weibull modela adecuadamente la cinética de fermentación en la primera etapa de producción de queso *Petit Suisse*, el ajuste de los datos experimentales tiene un coeficiente de correlación ($R^2 > 0,98$) y se considera aceptable para predecir los valores de (α, β y Ye).

Los parámetros α, β y Ye evaluados dentro del diseño de experimentos se ven afectados principalmente por la interacción de las dos variables (presión y tiempo),la mayor concentración de ácido láctico en el equilibrio (6.968 g/L) se obtiene a una presión de 400 MPa cuando se aplica por 22 minutos, esto significa que los valores más bajos de α producen que la fermentación sea más rápida y pueden reducir hasta en un 12% el tiempo del proceso, de fermentación de 141,612 min para el control a 123,50 min para las muestras tratadas por HHP.

En el modelo de Weibull Ye que es la producción de ácido láctico en el equilibrio depende del parámetro α que representa la tasa de cambio en la fermentación y este a su vez está relacionado con el número inicial de microorganismos, por lo tanto, para mejorar la estimación de los parámetros del modelo será necesario estimar las variables de respuesta (α, β y Ye) en función de la biomasa (Cinética microbiana) y no de la acidez titúlable, para disminuir la dispersión del parámetro de α.

Después de realizar el estudio reológico, se llegó a la conclusión que el fermentado tiene comportamiento tixotrópico y que la función linearizada de Weltmann, modela adecuadamente el comportamiento, el ajuste de los datos experimentales

tienen un coeficiente de correlación ($R^2 > 0,95$), dentro de las variables evaluadas, la presión y la interacción de presión y tiempo, tienen influencia sobre la consistencia. Se observó que al aplicar presiones de 400 MPa por 22 minutos, el índice de fluidez baja, es decir el producto tiene mayor consistencia, lo que afecta en forma positiva la calidad.

Las diferencias en la textura se deben a las diferencias en las interacciones de las proteínas, promovidas por la variación de la presión, uno de los efectos principales de la presión sobre los componentes es la modificación de la estructura y la funcionalidad de la proteína, la aplicación de presiones de 600 MPa, provocan desnaturalización profunda de las proteínas y afectan seriamente las interacciones proteína-proteína, dando como resultado productos de menor consistencia.

A partir del coagulo acido (queso), es posible formular un producto basándose en el diseño de mezclas. Los resultados mostraron que en el perfil sensorial el contenido de azúcar y no solamente el contenido de fruta condiciona la respuesta del sabor y la aceptación sensorial, respecto al aroma la respuesta sensorial está asociada al nivel de fruta en la formula y la textura tiene mayor relación con el contenido de queso en la mezcla.

La evaluación estadística individual de cada uno de los atributos, se expresa como una superficie de respuesta y genera la ecuación de optimización correspondiente, mediante la cual se puede calcular la formulación que maximiza la respuesta sensorial. Al resolver la ecuación y después de la interpretación de los resultados y en consideración al diseño del triángulo de mezcla, se seleccionó como la formulación más idónea en cuanto a la respuesta sensorial, una combinación del 80% en peso de coagulo (conformado por el coagulo fermentado y la adición de crema de leche), un 10% de pulpa de fruta y un 10% de azúcar.

Los parámetros de calidad del producto fermentado mostraron una degradación dependiente del tiempo y la temperatura de almacenamiento. El valor de pH de las muestras varió de 4,58 para la muestra de control (0 días / 4 ° C) a 4,0 para la muestra que permaneció durante 40 días a 15°C ($p < 0,05$) . La acidificación de los productos tratados por alta presión aún bajo almacenamiento refrigerado está asociado al crecimiento descontrolado de las bacterias acido lácteas, confirmando la tolerancia de las bacterias acido lácteas a presiones de hasta 400 MPa.

La respuesta de aceptación sensorial a lo largo del tiempo de almacenamiento está relacionada con la sensibilidad de los consumidores frente a la acidez de los productos, que es el principal cambio sensorial observado como resultado del aumento del metabolismo microbiano. La presencia adicional de bacterias acido lácteas puede

contribuir a disminuir la vida útil del producto, debido a una mayor producción de niveles de ácido láctico, que es percibido por los consumidores y en consecuencia, hay un mayor rechazo del producto.

El modelado de la cinética de degradación de la aceptación sensorial tiene coeficientes de correlación altos para una cinética de orden cero, por lo tanto, se usó la ecuación de orden cero para la estimación de la vida útil sensoria, como criterio se usa la frecuencia acumulada de las calificaciones del panel sensorial, considerando como valor límite de aceptación una calificación de 4 (Me gusta).

El modelo cinético demostró ser una metodología adecuada para determinar la vida útil del producto, los consumidores se mostraron sensibles a los cambios en las características sensoriales introducidos en los productos que pueden relacionarse con el metabolismo de las bacterias pro bióticas presentes en la formulación expresadas en valores de pH y concentraciones de ácido láctico. Considerando un 25% de rechazo por parte del consumidor, la vida útil del producto fermentado se estimó en 40 días para el producto tratado por HHP y 26 días para el control sin tratamiento pos fermentación.

CAPÍTULO 5- Desarrollo de Producto gelificado a partir de proteínas de suero

Geles para tratamiento HHP

5 Desarrollo de Producto gelificado a partir de proteínas de suero

5.1.1 Introducción

Los suplementos de proteínas juegan un papel importante en la dieta de los atletas de resistencia, ya que el ejercicio en sí mismo conduce a un grado de degradación y daño muscular y en este sentido, los suplementos de proteínas adecuados pueden desempeñar un papel vital en la recuperación, pues tienen que ver con el mantenimiento óptimo de los niveles de glucógeno.

Los geles para deportistas disponibles en el mercado son soluciones acuosas de carbohidratos con adición o no de proteínas completas o de aislados proteicos y aminoácidos a los que se agrega goma xantana y benzoato de sodio como conservante. El propósito de esta investigación es desarrollar un producto apto para deportistas, que incorpore proteína de suero, en forma de concentrado (WPC) o como aislado (WPI) con leche descremada, como fuentes de proteína y desarrollar las características sensoriales de la gelificación apoyada en la tecnología de ultrasonido de potencia (UP) y altas presiones hidrostáticas (HHP) que además de promover la gelificación en frio, actúan como proceso de conservación para garantizar la vida útil sin el uso de conservantes. La investigación se centra en comprender los cambios a nivel de la estructura y las interacciones de las proteínas entre sí y con el agua, su efecto sobre la textura y la aceptación sensorial. Los efectos combinados de UP y HHP producen cambios en la funcionalidad tecnológica de las proteínas permitiendo el desarrollo de productos. Para evaluar el efecto de las variables presión (MPa) y tiempo (min) de HHP, y de aplicación o no de UP, se usa un diseño factorial que define las condiciones de pretratamiento con ultrasonido en la fase de dispersión y HHP en la etapa de gelificación. Se usan como variable de respuesta el comportamiento reológico y la aceptación sensorial. Como resultado se obtiene que las mezclas de concentrado de proteína de suero WPC (20%, p / p) y carragenina (0,5% p / p) pre tratados por 3 minutos a 173 W y después tratados por HHP a 600 MPa durante 5 min a temperatura ambiente forman agregados de proteínas y asociaciones de carragenina en una estructura de gel débil de buena aceptación sensorial, mientras que el tratamiento HPP de la misma mezcla de WPI da lugar a un gel fuerte de muy baja aceptación sensorial.

Los resultados de las mezclas con aislado de proteína de suero (WPI) en concentración del 20% (p / p) en presencia de carragenina (0,5% p / p). pre tratados por UP 173W/ 6 min y tratados por HPP a 600 MPa durante 15 minutos desarrollan una reológia de gel fuerte y propiedades estructurales evaluadas por SEM diferentes de los

producidos sin el tratamiento de ultrasonido en términos del comportamiento reológico y la microestructura. Con base en el comportamiento reológico y la respuesta sensorial se define como fórmula del producto una mezcla de concentrado de proteína de suero WPC (20%, p / p) y carragenina (0,5% p / p) y leche fresca descremada, pre tratados por 6 minutos a 173 (W) y después tratados por HHP a 400 MPa durante 15 min.

5.1.2 Efecto del ultrasonido y HHP en la gelificación

Para establecer el efecto de las condiciones de pretratamiento por UP y gelificación por HHP sobre el comportamiento reológico, la respuesta sensorial y la microestructura en la producción de geles, se utiliza un diseño factorial. La Tabla 5.2-1. muestra el arreglo experimental y la propuesta de aleatorización de los ensayos.

Tabla 5.2-1 Diseño experimental para la ejecución de los experimentos

Orden aleatorio	*Ensayos*	*UP*	*HHP*	
			Presión	*tiempo*
5	1	Sin UP	600	5
7	2	Con UP	600	5
1	3	Sin UP	400	5
9	4	Sin UP	400	15
16	5	Con UP	600	15
8	6	Con UP	600	5
15	7	Con UP	600	15
4	8	Con UP	400	5
12	9	Con UP	400	15
11	10	Con UP	400	15
14	11	Sin UP	600	15
10	12	Sin UP	400	15
2	13	Sin UP	400	5
6	14	Sin UP	600	5
13	15	Sin UP	600	15
3	16	Con UP	400	5

De la revisión de literatura, se sabe que la cantidad mínima de proteínas de suero para la gelificación inducida por presión es mayor para el concentrado de proteína (WPC) que para el aislado WPI debido a que el mayor contenido de lactosa en WPC actúa como un agente baro protector. (Lim, Swanson, Ross, & Clark, 2008) La concentración mínima de WPI para formar geles bajo presión es del 10% p / p, las soluciones diluidas de WPI (1–8% p / p) no gelifican después del tratamiento de HHP a 1000 MPa y 30° C durante 10 min (Lim, Swanson, Ross, et al., 2008; Rich & Foegeding,

2000), sin embargo, una solución WPI al 10% p / p forma geles con un tratamiento de 600 MPa, se sabe también que la presión más baja suficiente para inducir la gelificación de una solución de WPI al 12% es 400 MPa (Lim, Swanson, Ross, et al., 2008).
Con estos antecedentes se escoge como nivel de mezcla para las proteínas WPC y WPI 20% p/p de una formulación preparada usando como solvente leche descremada liquida (LDL), este arreglo da un total de 16 ensayos por cada proteína evaluada. Para lograr una correcta dispersión de la carragenina y la estevia en las formula, se mezclan directamente en polvo sobre la proteína pesada según las necesidades de la formulación.

Tabla 5.2-2 Formulaciones de mezclas WPC y WPI

Componente	*Formula g/100g*	*%*
Proteína	20,00	20,0%
Carragenina	0,30	0,3%
Estevia	0,03	0,0%
Saborizante	0,03	0,0%
LDL	79,64	79,6%
	100	

Las soluciones de proteína de suero con concentraciones de 20% p / p se preparan dispersando polvo de WPI o WPC y los demás componentes en la leche descremada bajo agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente, seguido del tratamiento de ultrasonido según el diseño experimental, con almacenamiento durante la noche (20−24 h) a 5 °C para permitir una hidratación completa y la eliminación de las burbujas que provocan la agitación y el ultrasonido.

Las soluciones WPI o WPC se mezclan durante 1 minuto al día siguiente, para garantizar la homogeneidad y se empacan en volumen de 60 mL en bolsas de Nylon-Poliamida de 65 micras para la presurización en frío según las condiciones definidas en el diseño experimental. La verificación del pH indica que se mantiene entre 7,05 y 7,02, por lo tanto, se consideran soluciones neutras.

5.1.3 Análisis de los geles

5.1.4 Capacidad de retención de agua

La cantidad de agua ligada en los geles proteicos, cambia con la naturaleza de la proteína y con las condiciones de procesamiento, como los geles proteicos están constituidos por una matriz de cadenas de proteínas donde se encuentra ocluida la fase acuosa, la retención de agua está fuertemente ligada a la microestructura del gel (Lucey, 2009; Wijayanti et al., 2014).

El agua en la estructura de los geles es físicamente inmovilizada por la estructura proteica y no puede ser expulsada por presión. Los grupos CO y NH expuestos durante la desnaturalización provocada por el ultrasonido y la combinación del tiempo y la presión, se convierten en centros polarizados creando a lo largo de la cadena poli peptídica un sistema de multicapas de agua, con la estructura necesaria para la inmovilización del agua libre. Otra forma de ligar agua es a través de los poros de la red proteica que pueden retener agua por fenómenos de capilaridad (Regnault et al., 2004).

En la tabla 5.2-3 se ven los resultados de retención de agua de los geles preparados bajo las condiciones del estudio con los dos tipos de proteína utilizados, en general los geles de WPC tiene más capacidad de retención, provocada posiblemente por fenómenos de solubilización del mayor contenido de lactosa presente.

El tratamiento con ultrasonido, en todos los casos provoca una menor retención de agua, asociado a fenómenos como el cambio en la hidrofobicidad superficial, que mejora las interacciones proteína-proteína, No necesariamente las interacciones de las proteínas con el agua.

Se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,002$) en el comportamiento frente a la retención de agua para los geles preparados con WPI y WPC.

Los geles proteicos están constituidos por una matriz de cadenas de proteínas donde se encuentra ocluida la fase acuosa (Lucey, 2009). Los geles tienen generalmente estructuras hidratadas que retienen el agua y los demás componentes de la formulación, algunos geles alimentarios pueden tener hasta un 95% de agua retenida por la estructura proteica y difícilmente extraíble por presión.

Durante la desnaturalización de las proteínas, se exponen grupos CO y NH se convierten en centros polarizados que interactúan con el agua en un sistema multicapas que durante la gelificación forman nuevos puentes hidrógeno, generando la estructura necesaria para la inmovilización del agua libre. Otra forma de ligar agua es

a través de los poros de la red proteica que pueden retener agua por fenómenos de capilaridad (Thompson, 2014).

Tabla 5.2-3 Datos de capacidad de retención de agua

Ensayos	WPC	WPI
400-5-SU	97,5±1,0 a	96,5±1,0 a
400-5-CU	96,0±0,5 a	96,5±1,0 a
400-15-SU	95,0±1,2 b	92,5±1,2 b
400-15-CU	92,5±0,8 c	90,5±1,6 c
600-5-SU	95,0±0,8 b	91,5±1,2 b
600-5-CU	95,5±1,0 b	90,5±1,6 c
600-15-SU	87,5±1,0 d	83,5±1,0 d
600-15-CU	84,5±1,0 e	78,0±1,5 e

Valores marcados con letras diferentes en una misma columna indican que tienen una diferencia estadísticamente significativa $(p < 0.05)$

Al aumentar el tiempo de tratamiento y la presión, se reduce significativamente la capacidad de retención, lo que está relacionado con la estructura más cerrada que presentan los geles obtenidos a presiones de 600 MPa y 15 minutos de tratamiento, tal como está descrito en la relación de entre la sinéresis y la reológia de las partículas de los geles por (van Vliet, van Dijk, Zoon, & Walstra, 1991).

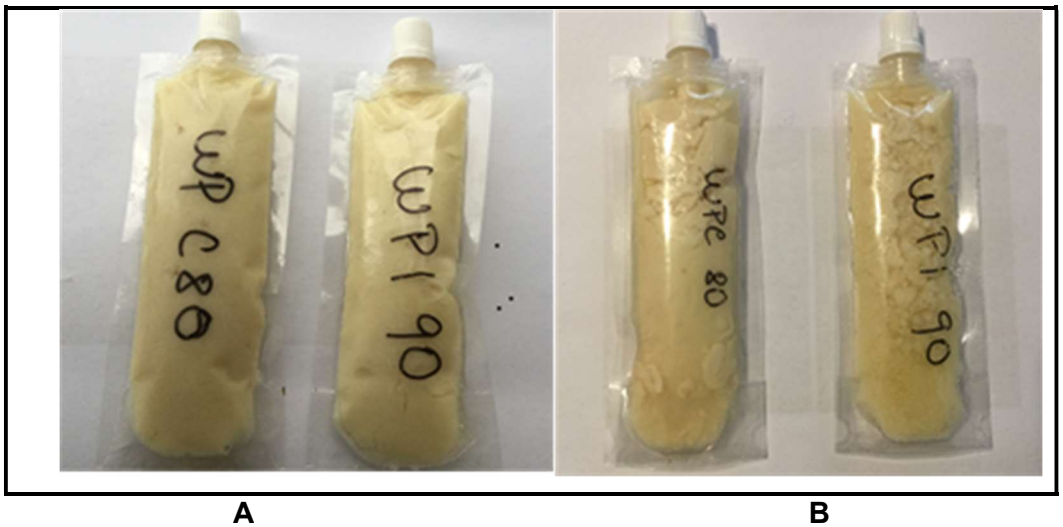


Figura 5-1 (A) Geles preparados a 400 MPa-15 min, (B) Geles preparados a 600 MPa -15 min

La Figura 5-1 ilustra una muy fuerte pérdida de líquido por los geles obtenidos a 600 MPa - 15 minutos, que presentan una estructura cerrada, en un gel fuerte con tendencia a la sinéresis después de un almacenamiento de 30 días bajo condiciones de refrigeración.

5.1.5 Comportamiento reológico

Los ensayos se llevaron a cabo en un reómetro (Paar - Physica MCR 301, Anton Paar GmbH, Ostfildern, Alemania) utilizando un sensor de platos paralelos con una separación de 1 mm entre ambos platos. El equipo se programó de manera tal que en todos los casos las medidas se realizaron por triplicado. Las muestras, se colocaron (1 ml) sobre el plato inferior termostático a 35ºC durante 45 minutos para permitir acondicionamiento, para prevenir la deshidratación de la muestra se adiciona silicona de baja viscosidad alrededor del borde de los platos.

El rango de visco elasticidad lineal se determina, midiendo G* en función de la deformación (barrido de deformación). Con base a estos resultados, los barridos de frecuencia (ω= 1 rad/s) de las muestras se realizan a la misma deformación (*d* = 10%), dentro de los límites de la linealidad. Los datos experimentales se ajustan a la siguiente ecuación (Steffe, 1996b):

$$G' = a\omega^{b}$$

Donde *a* y *b* son parámetros que caracterizan el comportamiento reológico, y son obtenidos por un método de ajuste no lineal.

Para la caracterización visco elástica de las muestras se realiza, luego de la gelificación, mediante un barrido de frecuencias donde se analiza la variación de G', G'' y η* en función de la frecuencia de oscilación angular, y se comparan los resultados con los modelos anteriormente descriptos. En todos los casos G' y G'' están expresados en Pascales (Pa) y la η* en Pascales segundo (Pas).

Cuando se analiza el espectro mecánico de las muestras representado en los módulos elástico (G'), modulo viscoso (G'') y viscosidad compleja (η*) en función de la frecuencia de oscilación angular de los geles preparados a diferentes condiciones de presión y tiempo y con la aplicación o no de ultrasonido de potencia, se encuentra que para las dos proteínas ensayadas el modulo elástico G' fue mayor que el modulo viscoso G'' en todo el rango de frecuencias ensayadas.

Las Tablas 5.2-4 y 5.2-5 recogen estos resultados, mostrando que, dentro del rango de frecuencias de oscilación estudiadas, G' y G'' variaron en función de la presión y el tiempo del tratamiento. Además, G' es mayor que G'' en todo el rango de

frecuencias de oscilación y condiciones ensayadas por lo que, de acuerdo al modelo de Giboreau y col. (1994) estas muestras se comportarían, desde el punto de vista reológico, como materiales tipo gel. Estos geles reflejan la existencia de una matriz tridimensional estable a altas frecuencias de oscilación (Alvarez, 2008; Ferry, 1980; Steffe, 1996b).

Tabla 5.2-4 Valores G´, G´´ y G* para geles de WPC (ω = 1 rad/s).

Ensayos	G´	G´´	G*
400-5-WPI-SU	1154.58 ±8.67a	1039.12± 7.80 [a]	32.24± 0.12 [a]
400-5-WPI-CU	1467.09 ±17.82 a	1320.38± 16.03 [a]	36.34± 0.22 [a]
400-15-WPI-SU	1322.22± 0.87 [a]	976.66± 0.66 [b]	31.25 ± 0.01 [b]
400-15-WPI-CU	1735.12± 7.48 [a]	520.54± 2.24 [b]	22.82± 0.05[c]
600-5-WPI-SU	1876.9 ± 57.74 [b]	1407.67± 41.80 [c]	37.52± 0.56 [a]
600-5-WPI-CU	2630.5 ± 229.61 [c]	1315.25± 31.71 [d]	36.24± 1.57 [a]
600-15-WPI-SU	4529.72 ± 126.84 [d]	1132.42± 31.71 [b]	33.65± 0.47 [b]
600-15-WPI-CU	4904.23 ± 35.7 [d]	613.03± 4.47 [c]	24.76± 0.09 [c]

Valores marcados con letras diferentes en una misma columna indican que tienen una diferencia estadísticamente significativa $(p < 0{,}05)$

Tabla 5.2-5 Valores G´, G´´ y G* para geles de WPI (ω = 1 rad/s).

Ensayos	G´	G´´	G*
400-5-WPC-SU	936.06 ±36.84a	842.46± 33.12 [a]	29.02± 0.57 [a]
400-5-WPC-CU	973.58 ±14.91 a	730.18± 11.18 [a]	27.02± 0.21 [b]
400-15-WPC-SU	1157.22± 22.21 [B]	867.92± 16.66 [a]	29.46± 0.28[a]
400-15-WPC-CU	1264.05± 27.24 [B]	467.70± 10.08 [b]	21.63± 0.23 [c]
600-5-WPC-SU	1667.69 ± 16.71 [C]	667.08±6.68 [c]	25.83± 0.13 [d]
600-5-WPC-CU	2211.78± 10.61 [d]	552.95± 2.65 [d]	23.51± 0.06 [e]
600-15-WPC-SU	4658.11 ± 18.74 [e]	465.81± 18.07 [d]	21.58± 0.42 [c]
600-15-WPC-CU	4920.90 ± 72.32 [f]	492.09± 7.23[e]	22.18± 0.6 [f]

Valores marcados con letras diferentes en una misma columna indican que tienen una diferencia estadísticamente significativa $(p < 0{,}05)$

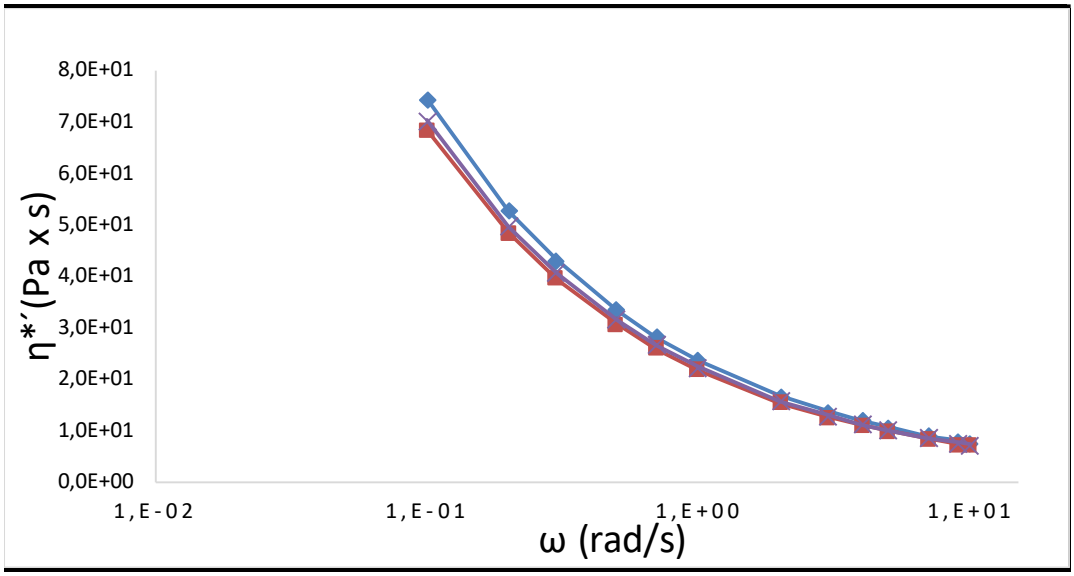


Figura 5-2 Viscosidad compleja (η*), (♦) 600-5-CU, (¥) 600-15-CU, (■) 600-15-SU

La viscosidad compleja (η*) es una medida de la magnitud de la resistencia total de la muestra al esfuerzo de corte dinámico. La Figura 5-2 muestra cómo dicho parámetro decrece linealmente con el aumento de la frecuencia de oscilación en las condiciones ensayadas.

La Figura 5-3 muestra la variación de los módulos elásticos (G') y viscoso (G'') con la frecuencia (ω en rad/s). El cambio pronunciado en el valor de G' que sucede por efecto de la presión, concuerda con la desnaturalización de las proteínas del suero como se discutió en el capítulo 3.

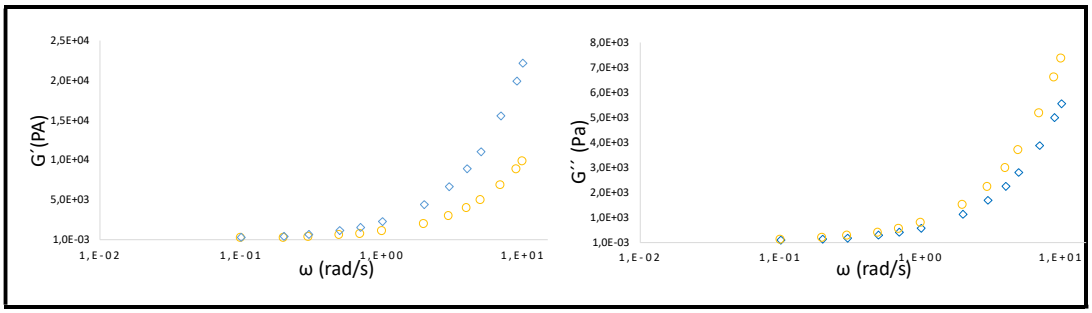


Figura 5-3 Efecto de la presión sobre G´ y G´´ , (♦) 600-5-CU, (●) 400-5-CU

El cambio en G' puede ser explicado teniendo en cuenta que, a medida que la proteína se desnaturaliza, los grupos sulfihídrilos expuestos comienzan a participar en reacciones de intercambio sulfihídrilos – disulfuro, que además son favorecidas a pH neutro de los geles. El tratamiento a presiones más elevadas en mezclas pre tratadas con ultrasonido, aumenta el modulo elástico de forma más importante que la

contribución a la disminución del módulo viscoso, lo que da como resultado, geles más fuertes y elásticos que tiene fuerte tendencia a la perdida de líquido.

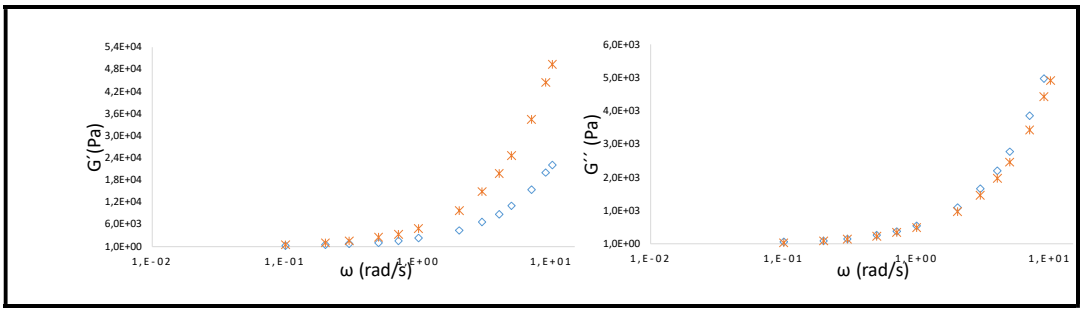


Figura 5-4 Efecto del tiempo sobre G´ y G´´, (♦) 600-5-CU, (¥) 600-15-CU

Aumentar el tiempo de tratamiento también contribuye al aumento del módulo elástico, pero muestra una menor contribución a la reducción del módulo viscoso, asociado esto también a la disminución de la tangente del ángulo de desfase ($Tan = G''/G'$) que puede ser considerada como un indicador de la organización estructural (interacciones intermoleculares) en un material; materiales altamente estructurados producen, generalmente, valores bajos de Tan a medida que G' predomina sobre G''. El aumento del tiempo de tratamiento, promovería la organización estructural a través de las interacciones hidrofóbicas generadas (Alvarez, 2008).

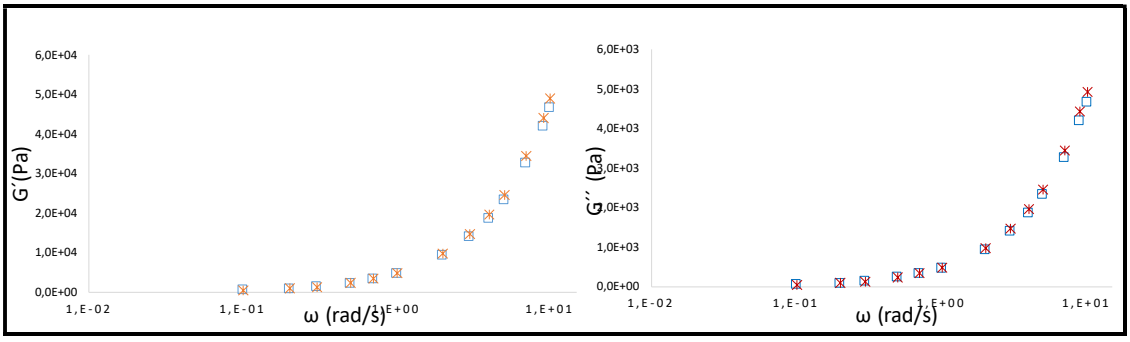


Figura 5-5 Efecto ultrasonido sobre G´y G´´, (¥) 600-15-CU, (■) 600-15-SU

Tal como se ve en la Figura 5-5, el tratamiento de ultrasonido tiene poco efecto en el aumento del módulo elástico G¨ y en la disminución del módulo viscoso G´´ en todas las condiciones evaluadas.

Chandrapala, Zisu, et al. (2012 reportan que el tratamiento con ultrasonido de soluciones de leche con suero en proporciones de 80:20 y 60:40, produjo agregados por condiciones hidrofóbicas, debido a que las fuerzas de corte generadas a partir de

la sonicación producen una asociación de las proteínas del suero desnaturalizadas con ellas mismas y con las caseínas.

Los datos experimentales se ajustan a la ecuación de Steffe mencionada anteriormente (Steffe, 1996b), las Tablas 5.2-5 y 5.2-6 muestran los valores de a y b calculados para cada tipo de proteína y condición de proceso, los valores encontrados corresponden a un gel típico donde los valores se encuentran alrededor de 5626 Pas y 0,0371, para a y b (Steffe, 1996b).

Los resultados indican que cuanto más alta es la presión y el tiempo de tratamiento más alto es el valor de a y bajo el valor de b. Este hecho sugiere, de acuerdo a este modelo, los geles muestran un comportamiento de gel fuerte, probablemente debido a la presencia de puentes disulfuro que incrementan el comportamiento de tipo sólido. Siendo este efecto mayor en los geles producidos con WPI.

Tabla 5.2-6 Parámetros del modelo reológico para geles de WPC

Ensayos	*a*	*b*	*Tanδ*
400-5-WPC-SU	1262.6 ± 88.8 [a]	0.17± 0.04 [a]	0,90
400-5-WPC-CU	1345.7 ± 18.3 [a]	0.21± 0.05 [a]	0,75
400-15-WPC-SU	1635.9 ± 44.05 [b]	0.25± 0.02 [b]	0,70
400-15-WPC-CU	1799.9± 44.35 [b]	0.27± 0.01 [b]	0,90
600-5-WPC-SU	2247.1 ± 48.6 [c]	0.17± 0.04 [a]	0,37
600-5-WPC-CU	2611.5 ± 81.8 [d]	0.06± 0.02 [d]	0,25
600-15-WPC-SU	5277.1 ± 35.3 [e]	0.04± 0.01 [e]	0,10
600-15-WPC-CU	5592.1 ± 42.6 [f]	0.04± 0.01 [f]	0,10

Valores marcados con letras diferentes en una misma columna indican que tienen una diferencia estadísticamente significativa $(p < 0{,}05)$

En relación con el valor de la Tanδ los valores mayores a 1 indican un predominio de las características viscosas, por el contrario, valores de Tan menores que 1 indican un predominio de las características elásticas (Tabla 5.2-6).

El aumento en la presión ocasiono en todos los casos una disminución de los valores de la tangente, indicando el predominio de un comportamiento elástico, los geles preparados a 400 MPa y 5 minutos tiene comportamiento de geles débiles.

Tabla 5.2-7 Parámetros del modelo reológico para geles de WPI

Ensayos	*a*	*b*	*Tanδ*
400-5-WPI-SU	1519.9± 25.6[a]	0.14± 0.01 [a]	0,90
400-5-WPI-CU	1667.9 ± 57.4 [b]	0.04± 0.01 [b]	0,90
400-15-WPI-SU	1815.9 ± 19.5 [c]	0.22± 0.02 [c]	0,75
400-15-WPI-CU	2259.9 ± 37.5 [d]	0.13± 0.02 [d]	0,75
600-5-WPI-SU	2653.4± 99.32 [e]	0.25± 0.02[e]	0,30
600-5-WPI-CU	3244.5 ± 42.8 [f]	0.10± 0.07 [f]	0,50
600-15-WPI-SU	5605.7 ± 84.3 [g]	0.09± 0.03 [f]	0,25
600-15-WPI-CU	5693.07 ± 72.6 [g]	0.05± 0.01 [a]	0,13

Valores marcados con letras diferentes en una misma columna indican que tienen una diferencia estadísticamente significativa $(p < 0{,}05)$

El tratamiento por ultrasonido favorece dos tipos de fenómenos opuestos: a) ruptura de los puentes hidrógeno y disminución de las interacciones electrostáticas, lo que debilita las interacciones intermoleculares; y b) estabilización de las interacciones hidrofóbicas, lo que favorece la asociación de las proteínas para dar una estructura tridimensional. El valor de G' es el resultado del balance de estos dos fenómenos; si predomina el primero de ellos el módulo elástico será pequeño, en cambio sí domina el segundo, G' alcanzará valores elevados (Chandrapala, Zisu, et al., 2012; Rahaman et al., 2016).

Con base en estos hechos, se deduce que el tratamiento de ultrasonido incrementa las interacciones hidrofóbicas entre moléculas de proteínas favoreciendo estructuras más elásticas y cerradas con mayores valores del parámetro a y valores más bajos del parámetro b.

La firmeza de los geles WPI y WPC se ve muy afectada por el grado de desnaturalización y está vinculado a la cantidad de enlaces disulfuro, que estabilizan la microestructura del gel inducido por presión. El tiempo de mantenimiento más largo, 15 min, a 600 MPa da geles con mayor firmeza que el tratamiento HHP durante solo 5 min, ya que se forman más enlaces disulfuro y menos no covalentes (Patel et al., 2006).

5.1.6 Análisis de microestructura por microscopía CRIO-SEM

Para mejorar la comprensión del comportamiento reológico de los geles desarrollados, se utiliza la técnica de Crio-SEM para caracterizar las estructuras, los resultados se pueden ver en la Figura 5-6, donde se muestran distintos niveles de

aproximación a la estructura y la comparación de los dos tipos de proteína usados en la formulación.

Esta técnica Crio-SEM utiliza temperaturas por debajo de -80°C durante todo el protocolo de examen de la muestra. Las muestras se ubican en el disco porta muestras en estado fresco sin preparación previa y se congelan directamente en el Microscopio JEOL JSM-6490LV. Las observaciones se realizan a 10 kV (El-Bakry & Sheehan, 2014).

Los diversos materiales componentes de estos geles mixtos pueden apreciarse en las imágenes, las zonas oscuras corresponden a la solución acuosa ocluida en la estructura durante el proceso de gelificación, mientras que los objetos más claros corresponden a estructuras del gel mixto de la proteína y la carragenina.

La fase rica en proteínas constituye la pared de los alvéolos (Figura 5-6 E y F), mientras que la carragenina se convierte en la sustancia menos densa al interior de los alveolos (Figura 5-6 E). El estudio también confirmó el comportamiento de agregación de las proteínas que se constituyen a agregados globulares de tamaño muy superior al tamaño de las micelas de caseína (Figura 5-6 C).

El tipo de proteína y seguramente sus interacciones electrostáticas con la carragenina de carga negativa ocasionan microestructuras diferentes, por ejemplo los geles de WPI muestras una estructura alveolar de tipo colmena (Figura 5-6 F), mientras que los geles de WPC tienen una estructura más cerrada (Figura 5-6 E) lo que posiblemente ocasiona la mayor capacidad de retención de agua y la menor respuesta elástica, reflejada en los menores módulos viscoso G´, resultados equivalentes fueron descritos para sistemas mixtos de geles de proteínas y polisacáridos de distintas naturalezas (Kariml, 2008).

Los geles de WPI con estructura de panal muestran también la aparición de micro partículas posiblemente asociadas a la separación de fases entre la fase rica en proteínas y la fase rica en carragenina, previo a la gelificación, que se ven en la imagen como partículas pegadas en las paredes de los alveolos (Figura 5-6 F).

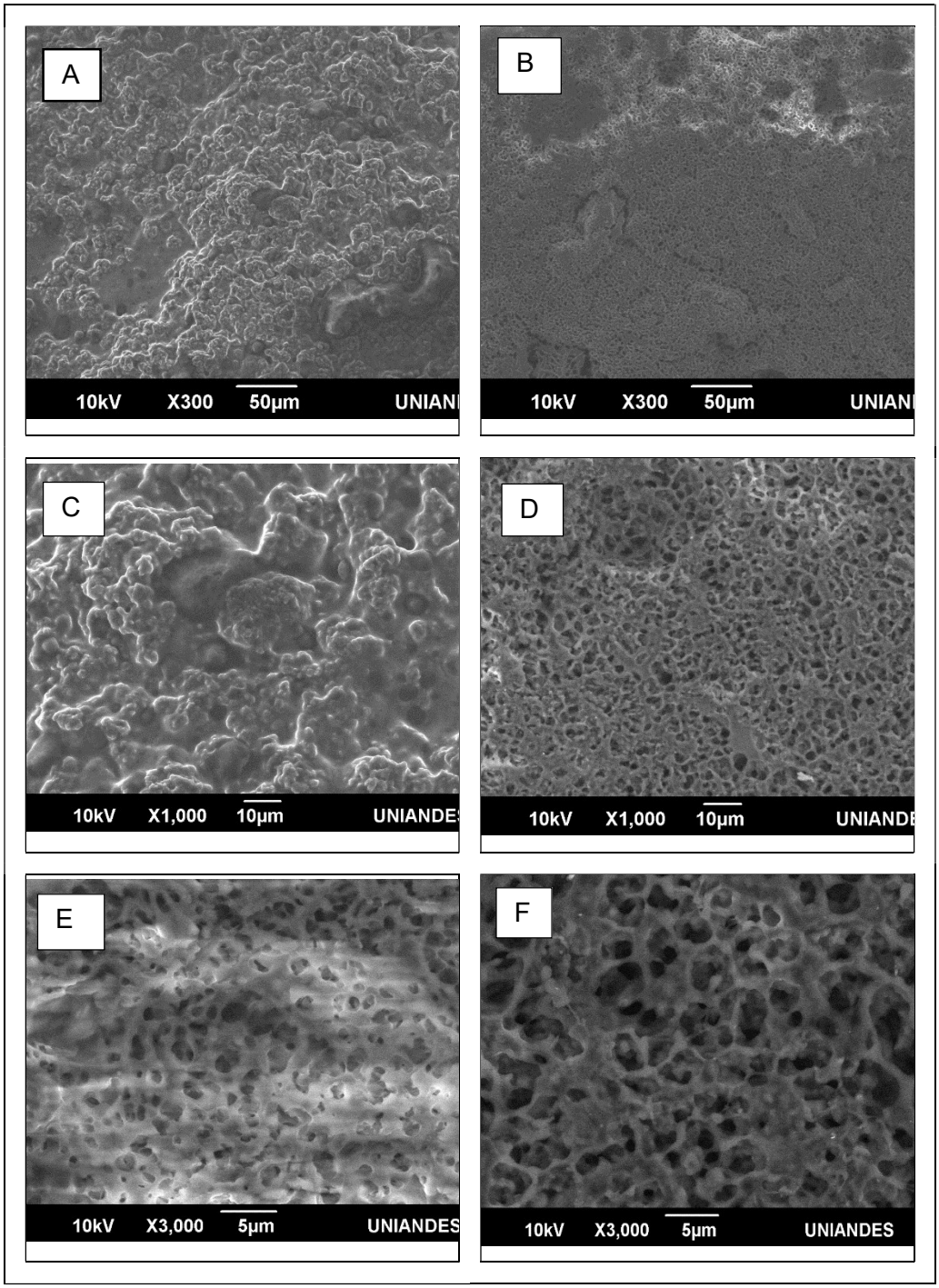


Figura 5-6 Imágenes de CRIO-SEM de la microestructura de geles inducidos por presión (A,C,E) son geles de WPC y (B,D,F) son geles de WPI preparados a 400 MPa - 15 min con pretratamiento de ultrasonido.

El tratamiento por ultrasonido causa también la agregación de la caseína y en consecuencia aumenta la interacción entre los dos polímeros, y fortalece la interacción electrostática entre la parte cargada positivamente de la caseína y el polisacárido

cargado negativamente dando lugar a grandes agregados como se puede ver en la Figura 5-7 G.

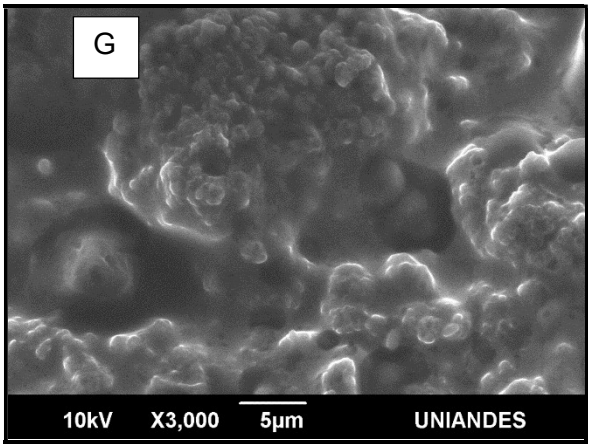


Figura 5-7 Agregados de caseína en Gel de WPC con pretratamiento de ultrasonido

Todos estos resultados son coherentes con los obtenidos por otros investigadores en geles mixtos de proteínas y polisacáridos, donde se revelan también estructuras muy parecidas a las obtenidas en este estudio (Fitria, 2013; Kariml, 2008).

5.1.7 Análisis sensorial

Se realizó una evaluación sensorial de los geles producidos bajo las condiciones del experimento para indagar sobre los atributos sensoriales. Se realizó un ensayo afectivo sobre un grupo de 41 panelistas seleccionados al azar, con edad entre los 19 y 25 años, con el objetivo de evaluar las opiniones y/o la aceptación del producto.

La prueba consiste en responder a una escala hedónica de 5 puntos, acerca de 5 aspectos del producto, Olor, Color, Sabor; Textura y Aceptación general, evaluados en ese orden sobre muestras codificadas, entregadas en cada sesión. Los datos se agrupan por frecuencias en cada uno de los valores de la escala: 5 Me gusta mucho; 4 Me gusta moderadamente; 3 Ni me gusta ni me disgusta; 2 me disgusta moderadamente; 1 Me disgusta mucho. El resultado de apreciación sensorial se califica como el promedio acumulado de las calificaciones numéricas.

Los resultados de la evaluación sensorial se muestran a continuación, donde lee la calificación de 41 panelistas de los atributos sensoriales en una escala afectiva (ICONTEC, 1998).

Tabla 5.4-1 Resultado evaluación geles WPI

Ensayos	*Color*	*Aroma*	*Sabor*	*Textura*	*Aceptación general*
400-5-WPI-SU	4,15	3,91	3,71	3,73	3,87
400-5-WPI-CU	4,10	4,00	3,80	3,73	3,91
400-15-WPI-SU	4,20	3,90	4,21	3,98	4,07
400-15-WPI-CU	4,34	4,00	4,44	4,00	4,20
600-5-WPI-SU	4,00	3,90	4,44	4,00	4,09
600-5-WPI-CU	4,17	4,00	4,10	3,50	3,94
600-15-WPI-SU	4,00	4,00	4,22	3,60	3,95
600-15-WPI-CU	4,34	4,00	3,95	3,00	3,82

En general la respuesta sensorial respecto a los atributos de aroma y sabor se mantienen en todas las muestras evaluadas. Las diferencias empiezan a ser importantes en el aspecto asociado a la textura, obteniendo mejor calificación los geles de comportamiento reológico mas viscoso que elástico, es por eso que las muestras correspondientes al tratamiento de 400 MPa y 15 minutos que tienen un valor de *Tan* de 0,7 resultan mejor calificadas que las muestras de tratamiento 600 MPa y 15 min con un valor de tangente de 0,1.

Las muestras tratadas a 600 MPa con un comportamiento preferentemente elástico resultan peor calificadas, dentro de los comentarios de los jueces se expresa que las muestras son demasiado duras, con dificultad para fluir y textura “cauchosa”; por otra parte, los geles producidos a 400 MPa por 5 minutos resultan demasiado flojos, con poca textura, sin embargo, la calificación de textura sigue siendo buena.

Con el fin de visualizar mejor estos resultados se usaron gráficos de red, que permiten ver las tendencias en cada uno de los atributos evaluados, la Figura 5-8, muestra el conjunto de las muestras evaluadas.

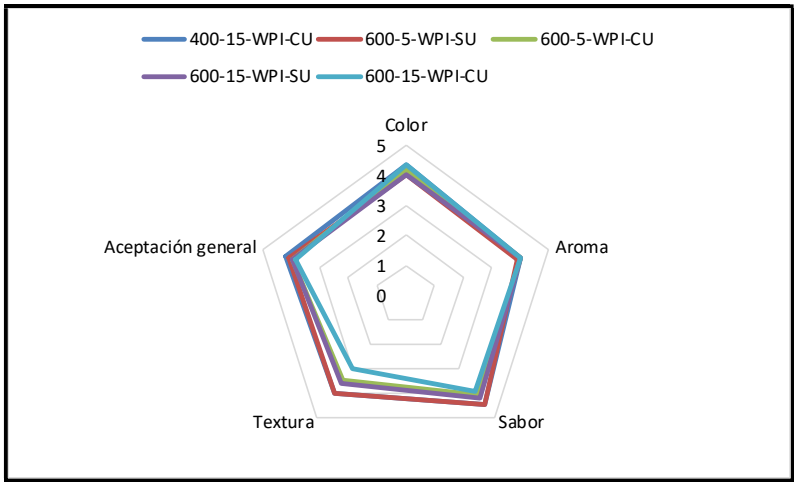


Figura 5-8 Perfil sensorial de geles WPI producidos por HHP

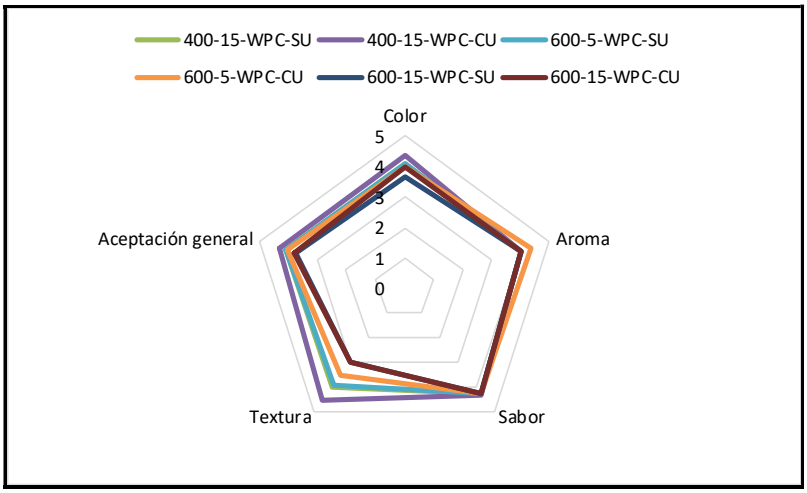


Figura 5-9 Perfil sensorial de geles WPC producidos por HHP

Viendo la Figura 5-9 se puede verificar que las muestras tratadas a presión de 600 MPa tienen en general una peor calificación respecto a la textura. Para ver más en detalle este efecto, la Figura 5-10 muestra un comparativo entre la muestra mejor calificada y la que obtuvo la calificación más baja.

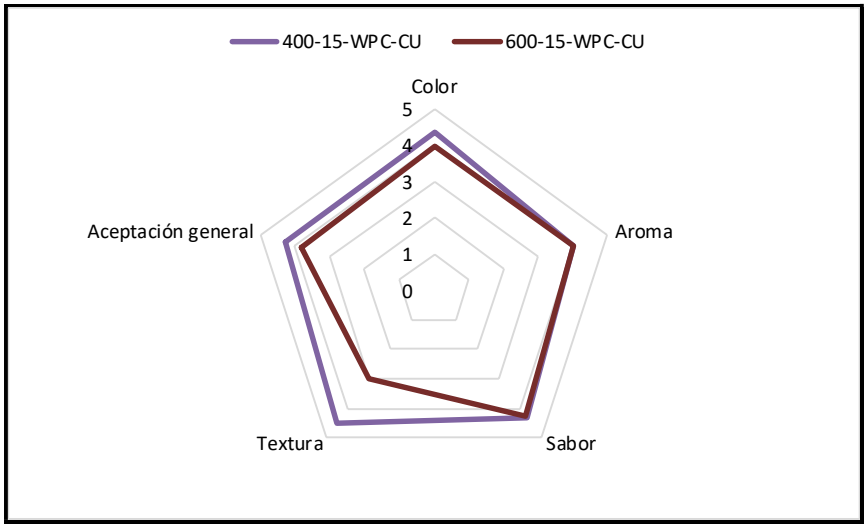


Figura 5-10 Comparativo muestra mejor calificada 400 MPa-15 min y 600MPa-15 min

La textura se define como la manifestación sensorial y funcional de las propiedades estructurales, mecánicas y de superficie de los alimentos detectados a través de los sentidos de la vista, la audición, el tacto y la cinestésica (Hernández, 2005; Karoui, 2017; Phimolsiripol & Suppakul, 2016). Los resultados de este estudio son coherentes con esta afirmación, pues tal como se logró establecer mediante las imágenes de SEM efectivamente la percepción sensorial está fuertemente relacionada con la microestructura y a su vez el comportamiento reológico es una expresión de esta misma condición. El enfoque de desarrollo de productos está basado siempre en el consumidor, por lo tanto, es a través del análisis sensorial que se validan todos los resultados instrumentales de caracterización de los productos.

El enfoque de diseño de productos basado en los consumidores enfatiza la necesidad de involucrar a los consumidores desde las primeras etapas del desarrollo y, en la medida en que sea posible, en todos los aspectos del proceso (Gavino, Isuiza, & Saavedra, 2018).

5.1.8 Análisis nutricional

Se calcularon los porcentajes de proteínas, lípidos, hidratos de carbono, agua y kilocalorías que aportan los geles mejor calificados en los parámetros fisicoquímicos y sensoriales, se hacen las comparaciones respectivas con los valores de la dosis diaria recomendada para adultos en una dieta de 2000 Kcal.

El valor energético se calcula utilizando los coeficientes energéticos con los valores propuestos por Atwater de 9 kcal (37,7 kJ) para la grasa, 4 kcal (16,7 kJ) para los carbohidratos y 4 kcal (16,7 kJ) para las proteínas, que se basan en la cantidad de energía que se libera cuando estos macronutrientes se oxidan metabólicamente, considerando una absorción intestinal incompleta (Pintor et al., 2016).

De la información bibliográfica se sabe que las proteínas del suero tienen la capacidad de modular la función inmunológica incrementando la producción de glutatión (GSH) en los tejidos, y preservar las reservas de glutamina muscular. Las proteínas del suero son también una excelente fuente natural de aminoácidos de cadena ramificada), los cuales son usados por el músculo para la síntesis de glutamina, que es exportada constantemente hacia la sangre dado que es el combustible metabólico esencial del sistema inmunológico (Hernández & Vélez, 2016).

Los geles seleccionados corresponden a la formulación basada en proteína concentrada de suero (WPC). Los datos de composición corresponden a la ficha técnica entregada por el proveedor de cada una de las materias primas en la formulación.

El certificado de análisis recibido del fabricante, registró los contenidos de grasa, ceniza y humedad de 5,9%, 2,32% y 5,77% (p / p), respectivamente. El contenido de proteína (6.38 × N) del polvo de WPC es de 83% (p / p; base seca), el contenido de lactosa es 5%. Con base en esta información y el balance de materiales se calcularon los aportes individuales de cada macronutriente y su aporte al valor energético total.

La composición de aminoácidos y el aporte de micronutrientes se consultaron en la bibliografía y se aplicó el mismo concepto de balance de materiales para calcular el aporte individual de los aminoácidos y su correspondencia con las necesidades nutricionales (Hernández & Vélez, 2016).

El valor diario recomendado(%VDR) para el aporte de los aminoácidos esenciales están calculados con base en las necesidades de un adulto de 70 kg de peso, en este sentido y como se puede ver en la Tabla 5.1-1, el gel proteico preparado cubre en muchos casos más del 100% de la necesidad (Gutiérrez, 2015).

Tabla 5.5-1-Aporte de aminoácidos del gel de WPC

Aminoácido	*mg/g de proteína*	*Aporte del gel mg/16g de proteína*	*Requerimiento para Adultos* [a]	
			mg/día [b]	*%VDR*
Histidina	17	272	700	39%
Isoleusina	76	1.216	700	174%
Leucina	118	1.888	980	193%
Lisina	113	1.808	840	215%
Metionina más Cisteína	52	832	910	91%
Fenilalanina más tirosina	79	1.264	980	129%
Treonima	84	1.344	490	274%
Triptofano	24	384	245	157%
Valina	72	1.152	700	165%
Total sin histidina	618	9.888	5.880	168%

[a] Basado en el balance de nitrógeno (16mg N/kgxdía)

[b] Basado en necesidades de un adulto de 70Kg

Adaptado de www.fao.org

En la Figura 5-11 se presenta una propuesta de tabla de información nutricional para el producto, diseñada con base en las directrices de etiquetado nutricional para Colombia, recogidas en la Norma NTC 512-2.

Información Nutricional
Tamaño por porción 80 g
Porciones por envase 1

Cantidad por porción 80 g
Calorías 85 kcal Calorías de grasa 11 kcal

	Valor diario*
Grasa Total 1,3g	17 %
Grasa saturada 0,8g	3 %
Colesterol 11mg	4 %
Sodio 150mg	6 %
Carbohidratos Total 3,9g	1 %
Fibra dietética 0 g	0 %
Azúcares 3,9g	
Proteína 14,4g	29 %

Vitamina A 4%	Vitamina C 0%
Calcio 15 %	Hierro 1%

*Los porcentajes de Valores Diarios está basados en una dieta de 2000 calorías.

Figura 5-11 Etiqueta nutricional para los geles según Norma NTC 512-2

En esta información se puede ver que el gel desarrollado proporcionaría un importante aporte de proteínas a la dieta, el producto aporta en una pequeña porción de 80 gramos el 29% del valor diario recomendado(VDR), si se compara con un filete de carne que aporta el 30% (Gutiérrez, 2015).

5.1.9 Análisis microbiológico

El estudio de los microorganismos presentes en los geles seleccionados por sus características reológicas y sensoriales muestra que el proceso de alta presión resulta muy efectivo en la reducción de la carga de microorganismos, en muestras analizadas en el día 0 de producción y en el día 15 en almacenamiento refrigerado no hubo crecimiento ni para el recuento de mesófilos totales (PCA), ni para hongos y levaduras (VCG).

Tabla 5.5-2 Recuento microbiano de muestras de Geles WPC y WPI

Muestra	*Presión Mpa*	*Tiempo*	*pH*	*PCA ufc/g día 0*	*VCG ufc/g día 0*	*PCA ufc/g día 15*	*VCG ufc/g día 15*
WPC	400	15		0	0	0	0
WPC	400	15		0	0	0	0
WPC	400	15		0	0	0	0
WPI	400	15		0	0	0	0
WPI	400	15		0	0	0	0
WPI	400	15		0	0	0	0

5.1.10 Discusión y Conclusiones

La combinación de las tecnologías de ultrasonido como pretratamiento y HHP resulto útil para crear propiedades sensoriales satisfactorias como la textura, la presencia de ingredientes estructurantes como la carragenina también contribuyo a las propiedades texturales y mecánicas finales de los geles desarrollados.

La gelificación de las proteínas de suero y las caseínas por el tratamiento a alta presión se asocian generalmente con la desnaturalización de las proteínas del suero y el re asociación de las caseínas, este efecto pudo ser visto en las características micro estructurales y en las propiedades reológicas de los geles fabricados.

La inclusión de otros ingredientes como la estevia y los saborizantes artificiales debería estudiarse con más detenimiento, pues si bien no se evidencio un cambio en la percepción sensorial, estos componentes podrían verse afectados o mejorados por HHP, proporcionando así una ventaja competitiva sobre las tecnologías convencionales como el tratamiento térmico que normalmente implica aumento en los niveles de aplicación de estos ingredientes.

Este trabajo demostró que el comportamiento reológico y la microestructura de los lácteos en sistemas de geles mixtos se pueden modificar mediante el procesamiento a alta presión (HHP) con resultados variables dependiendo del tipo de proteína WPI o WPC y las condiciones del proceso.

Cuando la leche descremada se mezcló con proteína concentrada de suero WPC dio como resultados geles blandos, la viscosidad aparente de las mezclas aumentó con el tratamiento a 400 MPa durante 15 min a temperatura ambiente, pero la aplicación de presiones más altas (600 MPa, 15 min, temperatura ambiente) dio como resultado una viscosidad aparente más alta con un módulo elástico G´ alto, lo que deriva en una baja calificación sensorial.

El nivel seleccionado de proteína de suero es adecuado en relación con los resultados sensoriales y texturales, además el balance de materiales indica un adecuado nivel nutricional para los propósitos del concepto del producto, definido en su concepción como un gel proteico para suplementar la dieta de deportistas.

La presión aplicada para estructurar el producto, resulto también suficiente para pasteurizarlos y garantizar la inocuidad alimentaria, sin embargo, se sugiere una prueba de desafío para validar estos resultados en un estudio de la vida útil del producto, además, es necesario también verificar aspectos como la estabilidad del sabor.

En el enfoque de desarrollo de productos basado en el consumidor, los resultados obtenidos a través del análisis sensorial validan todos los resultados instrumentales de caracterización del producto, se logró establecer mediante las imágenes de Crio-SEM la relación de la microestructura y el comportamiento reológico con la respuesta sensorial.

Al ser todavía la tecnología HHP un proceso costoso, los tiempos y las presiones de tratamiento podrían mejorarse por el uso en combinación de la tecnología de ultrasonido, resultando en un producto lácteo seguro y nutritivo con propiedades sensoriales aceptables bajo condiciones de proceso económicamente factibles.

Conclusiones generales

6. Conclusiones generales

Los resultados de este estudio muestran que el tratamiento HHP o ultrasonido de la leche aumentan el rendimiento quesero, afectando la formación de redes proteicas que aumentan la retención de agua dentro del queso, lo que se ve reflejado en el aumento del peso en el coagulo, además el contenido de nitrógeno del suero de la leche tratada disminuye progresivamente debido a que las proteínas desnaturalizadas el suero pasan a hacer parte de las proteínas en la cuajada en el proceso de coagulación y que si bien el caseinomacropéptido pasa a ser constituyente del suero, el contenido de nitrógeno tanto en la cuajada como en el suero reflejan en promedio estos dos fenómenos.

El comportamiento respecto a la adsorción de agua de las muestras tratadas por HHP liofilizadas, indican que el aumento en la retención del agua responde a un fenómeno físico por la mayor área superficial de las micelas desagregadas en partículas más pequeñas, y no a una interacción real con la superficie de la proteína, explicado por los más bajos valores de calor isostérico.

La formación de sitios hidrófobos en la superficie de las micelas de caseína como consecuencia de la aplicación de alta presión o del ultrasonido, se verifica a través de la tasa de unión de la sonda fluorescente reflejado en el aumento de absorbancia máxima y en el aumento de la pendiente (H_0) el despliegue de las proteínas inducidas por las fuerzas de cizallamiento expone los sitios hidrofóbicos seguidos de la agregación de las proteínas desplegadas al aumentar el tiempo de tratamiento lo que disminuye la hidrofobicidad superficial.

El análisis FTMIR especialmente de los sueros dializados, indican como común denominador a las dos tecnologías probadas, cambios en la estructura secundaria de la proteína que sugieren que la forma dimérica de β-Lg se disocia, seguida por la creación de nuevas conformaciones con estructuras plegadas definidas que consisten en láminas β y bobinas aleatorias, las bandas amplias generalmente indican una estructura más flexible y un aumento en el número de sub conformaciones diferentes. Por lo tanto, este efecto puede deberse al despliegue de proteínas en una estructura de bobina aleatoria más extensa, con la capacidad de hidratarse cada vez más, debido al rompimiento de los puentes de hidrógeno intramoleculares que forman interacciones intermoleculares entre el agua y los nuevos residuos de aminoácidos expuestos. Estas interacciones tienen consecuencias tecnológicas directas como el aumento en el rendimiento quesero y cambios en la textura de los productos de la coagulación.

El tratamiento de HHP o ultrasonido, provoca la desintegración de las micelas de caseína, así como la desnaturalización de las proteínas de suero. Durante la

reorganización de las micelas se forman polímeros auto agregados, con un rango de tamaño menor a las micelas nativas lo que después de la coagulación da lugar a estructuras más cerrada en los geles de cuajo. Este es un resultado directo de un Incremento en el número de partículas proteicas y del número de posibles sitios de agregación. Los cambios causados a la leche por la aplicación de las tecnologías en estudio, conducen a una matriz proteica más uniforme. Sin embargo, los tratamientos a las condiciones máximas de las tecnologías evaluadas (600 MPa o 205 W) se reduce la estructura de formación de gel y no se permite la formación de una red homogénea, disminuyendo la dureza y la interacción al punto de generar coágulos que no se pueden moldear. Las imágenes de SEM muestran que los quesos de leche tratada exhiben estructuras de gránulos más pequeños y fragmentos irregulares en comparación con los de leche no tratada.

El enfoque de desarrollo de productos basado en el consumidor, permite a través del análisis sensorial validar los resultados instrumentales de caracterización del producto, se logró establecer mediante las imágenes de CRIO-SEM la relación de la microestructura y el comportamiento reológico con la respuesta sensorial. Los consumidores se mostraron sensibles a los cambios en las características sensoriales tanto en el sabor como en la textura proporcionando información que logro ser modelada matemáticamente para ser usada también como mecanismo de predicción de la vida útil.

Bibliografía

6. Bibliografía

Alizadeh-Pasdar, N., Li-Chan, & Eunice, C. (2000). Comparison of Protein Surface Hydrophobicity Measured at Various pH Values Using Three Different Fluorescent Probes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*, 328–334. https://doi.org/10.1021/JF990393P

Alvarez, P. (2008). *High-pressure induced gelation of globular proteins*. McGill University. Retrieved from http://digitool.library.mcgill.ca:80/R/?func=dbin-jump-full&object_id=32348

Anema. (2012). Pressure-Induced Denaturation of β -Lactoglobulin in Skim Milk: Effect of Milk Concentration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*, 6565–6570. https://doi.org/https://doi.org/10.1021/jf301976n

Anema. (2014). The whey proteins in milk: thermal denaturation, physical interactions, and effects on the functional properties of milk. In *Milk Proteins* (Second ed., pp. 269–318). San Diego: Academic Press. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405171-3/00009-X

Anema, Lowe, E. K., & Stockmann, R. (2005). Particle size changes and casein solubilisation in high-pressure-treated skim milk. *Food Hydrocolloids*, *19*, 257–267. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2004.04.025

AOAC. (2000). *Official Methods of Analysis of AOAC International* (21st ed.). Arlintong.

Arzeni, C. (2014). *Modificación molecular y funcional de proteínas de clara de huevo mediante ultrasonidos de alta intensidad : aplicación de esta tecnología al diseño de nanovehículos para ácido fólico*. *Facultad de Ciencias Exactas y Naturales*. Universidad de Buenos Aires.

Awada, T. S., Moharramb, H. S., Shaltoutc, O. E., Askerd, D., & Youssefd, M. M. (2012). Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: A review. *Food Research International*, *48*(2), 410–427. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.05.004

Balthazar, C. F., Santillo, A., Guimarães, J. T., Bevilacqua, A., Corbo, M. R., Caroprese, M., … Albenzio, M. (2018). Ultrasound processing of fresh and frozen semi-skimmed sheep milk and its effects on microbiological and physical-chemical quality. *Ultrasonics Sonochemistry*, *51*, 241–248. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.10.017

Boonyaratanakornkit, B., Park, C. B., & Clark, D. S. (2002). Pressure efects on intra and intermolecular interactions in proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1595*, 235–249. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0167-4838(01)00347-8

Cadena, R. S., Bolini, H. M. A., Cruz, A. G., Pinheiro, H. P., Walter, E. H. M., Faria, J. A. F., & Sant'Ana, A. S. (2010). Survival analysis methodology to predict the shelf-life of probiotic flavored yogurt. *Food Research International*, *43*(5), 1444–1448. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.04.028

Carrascosa, A. V, & Olano, A. (1996). The Effects of High Pressure on Whey Protein Denaturation and Cheese-Making Properties of Raw Milk. *Dairy Foods*, *79*, 929–936. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(96)76443-3

Centre, R., North, P., Zealand, N., North, P., & Zealand, N. (2005). Denaturation of Lactoglobulin in PressureTreated Skim Milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*, 7783–7791.

Chandrapala, & Leong, T. (2014). Ultrasonic processing for dairy applications: recent advances. *Food Engineering Reviews*, *7*, 143–158.

Chandrapala, Martin, G. J., Kentish, S. E., & Ashokkumar, M. (2014). Dissolution and recon stitution of casein micelle containing dairy powders by high shear using ultrasonic and physical methods. *Ultrasonics Sonochemistry*, *21*(1658–1665). https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.04.006

Chandrapala, Martin, G., Zisu, B., Kentish, S., & Ashokkumar, M. (2012). The effect of ultrasound on casein micelle integrity. *Journal of Dairy Science*, *95*, 6882–6890. https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.2012-5318

Chandrapala, Zisu, B., Kentish, S., & Ashokkumar, M. (2012). The effects of high-intensity ultrasound on the structural and functional properties of α-Lactalbumin, β-Lactoglobulin and their mixtures. *Food Research International*, *48*, 940–943. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.02.021

Chawla, R., & Patil, G. R. (2011). High hydrostatic pressure technology in dairy processing : a review. *Journal of Food Science.Technology*, *48*, 260–268. https://doi.org/10.1007/s13197-010-0180-4

Chizoba Ekezie, F., Cheng, J.-H., & Sun, D.-W. (2018). Effects of nonthermal food processing technologies on food allergens: A review of recent research advances. *Trends in Food Science & Technology*, *74*, 12–25. https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2018.01.007

Considine, T., Patel, H. A., Anema, S. G., Singh, H., & Creamer, L. K. (2007). Interactions of milk proteins during heat and high hydrostatic pressure treatments — A Review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *8*, 1–23. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2006.08.003

D'amico, D. J., Silk, T. M., Wu, J., & Guo, M. (2006). Inactivation of microorganisms in milk and apple cider treated with ultrasound. *Journal of Food Engineering*, *69*, 556–563.

Dalgleish, D. G. (2011). On the structural models of bovine casein micelles - Review and possible improvements. *Soft Matter*, *7*(6), 2265–2272. https://doi.org/10.1039/c0sm00806k

Dalgleish, D. G., Spagnuolo, P. A., & Golf, D. H. (2004). A possible structure of the casein micelle based on high-resolution field-emission scanning electron microscopy. *International Dairy Journal*, *14*(12), 1025.1031.

Damodaran, S., Parkin, K. L., & Fennema, O. R. (2008). *Fennema's food chemistry (4th ed.)*. (Taylor and Francis Gp, Ed.) (4th ed). Boca Raton, FL: CRC Press.

Dzwolak, W., Kato, M., & Taniguchi, Y. (2002). Fourier transform infrared spectroscopy in high-pressure studies on proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1595*, 131–144.

El-Bakry, M., & Sheehan, J. (2014). Analysing cheese microstructure: A review of recent developments. *Journal of Food Engineering*, *125*(1), 84–96. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.10.030

Falloon, O. C., & Henry, N. (2015). Pressure resistance of cold shocked Escherichia coli O157 : H7 in ground beef , beef gravy and peptone water. *Journal of Applied Microbiology*, *7*, 1521–1529. https://doi.org/10.1111/jam.12794

Farrag, A. F., & Shendy, A. (2010). Denaturation and Viscosity of Whey Proteins Solutions as Affected by Frozen Storage. *Journal of American Science*, *6*(12), 49–62.

Ferrandini, E., Castillo, M., López, M., & Laencina, J. (2008). Modelos estructurales de la micela de caseína. *Anales de Veterinaria de Murcia*, *22*(0), 5–18. https://doi.org/doi:10.1111/j.1742-4658.2006.05545.x

Ferry, J. D. (1980). Dependence of viscoelastic behavior on temperature and pressure. In *Viscoelastic properties of polymers* (pp. 264–320). New York: Jojn Wiley.

Fitria, A. (2013). Altered Physicochemical Properties of Dairy Based Systems through High Pressure Processing, (August).

Fonseca, L. M., Leite, M. O., & Conrrado, R. S. (2012). Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) for MUN analysis in normal and adulterated Milk. *Arq.Bras.Med.Vet.Zootec.*, *64*(5), 1360–1366.

Gálvez, A. V., Aravena, E. L., & Mondaca, R. L. (2006). Isotermas de adsorcion en harina de maiz. *Ciencia y Tecnologia Alimentaria- Campinas*, *26*(4), 821–827. Retrieved from http://www.scielo.br/pdf/cta/v26n4/16.pdf

Gao, S., Lewis, G., Ashokkumar, M., & Hemar, Y. (2014). Inactivation of microorganisms by low-frequency high-power ultrasound: 1. Effect of growth phase and capsule

properties of the bacteria. *Ultrasonics Sonochemistry*, *21*(1), 446–453. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2013.06.006

Gavino, G., Isuiza, P., & Saavedra, N. (2018). Determinación del perfil de textura sensorial de dos muestras experimentales de hot- dog de pollo (Gallus gallus) obtenidas por Ingeniería Kansei Tipo II Determination of the sensory texture profile of two experimental chicken hot-dog samples. *Anales Científicos*, *79*(1), 210–217. Retrieved from file:///C:/Users/w7user/Downloads/Dialnet-DeterminacionDelPerfilDeTexturaSensorialDeDosMuest-6490050.pdf

Gil, J., Muratona, S., Yacanto, P., Soteras, E. M., & Abaca, C. (2013a). Isotermas de adsorción y desorción de agua en leche descremada en polvo. *Avances En Ciencia e Ingeniería*, *4*(1), 51–59.

Gil, J., Muratona, S., Yacanto, P., Soteras, E. M., & Abaca, C. (2013b). Isotermas de adsorción y desorción de agua en leche descremada en polvo water adsorption and desorption isotherms on non fat dry milk. *Avances En Ciencia e Ingeniería*, *4*(1), 51–59.

Glassford, S. E., Byrne, B., & Kazarian, S. G. (2013). Recent applications of ATR FTIR spectroscopy and imaging to proteins. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*. https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.07.015

Goyal, A., Sharma, V., Upadhyay, N., Sihag, M., & Kaushik, R. (2013). High Pressure Processing and Its Impact on Milk Proteins : A Review. *Journal of Dairy Science*, *2*(1), 1–9.

Grdadolnik, J. A. (2002). FTIR investigation of protein conformation. *Bulletin of the Chemists and Technologists of Macedonia*, *21*, 23–34.

Gülseren, İ., Güzey, D., Bruce, B. D., & Weiss, J. (2007). Structural and functional changes in ultrasonicated bovine serum albumin solutions. *Ultrasonics Sonochemistry*, *14*, 173–183.

Gunasekaran, S., & Ak, M. M. (2000). Dynamic oscillatory shear testing of foods — selected applications. *Trends in Food Science & Technology*, *11*(3), 115–127. https://doi.org/10.1016/S0924-2244(00)00058-3

Gutierrez-Mendez, N., Trancoso, N., & Leal, M. Y. (2013). Texture profile analysis of Fresh cheese and Chihuahua cheese using miniature cheese models. *Tecnociencia*, *VII*(2), 65–74.

Gutiérrez, A. (2015). *Caracterización de distintas proteínas de uso alimentario*. Universidad de Valladolid.

Hair, J. F., Tatham, R., Anderson, R., & Black, W. (1998). *Multivariate Data Analysis* (5th ed.). NY, U.S.A: Pearson.

Harte, F., Luedecke, L., Swanson, & Barbosa Cánovas, G. V. (2003). Low-Fat Set

Yogurt Made from Milk Subjected to Combinations of High Hydrostatic Pressure and Thermal Processing. *Journal of Dairy Science*, *86*, 1074–1082. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73690-X

Hernández. (2005). Evaluacion sensorial. *Evaluacion Sensorial*, 64. https://doi.org/10.1136/amiajnl-2013-002578

Hernández Ayuso, M. C. (2007). *Introducción a la programación lineal*. (Facultad de Ciencias UNAM, Ed.) (Primera). México: Universidad Nacional Autónoma de México.

Hernández, M., & Vélez, J. F. (2016). Suero de leche y su aplicación en la elaboración de alimentos funcionales. *Temas Selectos Para La Ingeniería de Alimentos*, *8*(2), 13–22.

Hinrichs, J., & Rademacher, B. (2004). High pressure thermal denaturation kinetics of whey proteins. *Journal of Dairy Research*, *71*(4), 480–488. https://doi.org/10.1017/S0022029904000238

Horne, D. (2009). Casein micelle structure and stability. In Abby Thompson;Mike Boland and Harjinder Singh (Ed.), *Milk Proteins:From expressión to food* (pp. 133–157). New Zealand: Academic Press.

Hu, G., Zheng, Y., Liu, Z., Xiao, Y., Deng, Y., & Zhao, Y. (2017). Effects of high hydrostatic pressure, ultraviolet light-C, and far-infrared treatments on the digestibility, antioxidant and antihypertensive activity of α-casein. *Food Chemistry*, *221*, 1860–1866. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.088

Huang, G. ., Chen, S. ., Tang, Y. ., Dai, C., Sun, L. ., Ma, H. ., & He, R. (2018). Stimulation of low intensity ultrasound on fermentation of skim milk medium for yield of yoghurt peptides by Lactobacillus paracasei. *Ultrasonics Sonochemistry*, *51*(September 2018), 315–324. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.09.033

Huppertz, T., Fox, P. F., & Kelly, A. L. (2004a). Effects of high pressure treatment on the yield of cheese curd from bovine milk. *Innovative Food Sciience and Emerging Technologies*, *5*, 1–8. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2003.09.001

Huppertz, T., Fox, P. F., & Kelly, A. L. (2004b). Food Chemistry Properties of casein micelles in high pressure-treated bovine milk. *Food Chemistry*, *87*, 103–110. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.10.025

Huppertz, T., Fox, P., & Kelly, A. (2004c). High pressure treatment of bovine milk : Effects on casein micelles and whey proteins High pressure treatment of bovine milk : effects on casein micelles and whey proteins. *Journal of Dairy Research*, *71*(1), 99–106. https://doi.org/10.1017/S002202990300640X

ICONTEC. (1998). Metodología iniciación y entrenamiento de evaluadores. In *NormasTecnicas Colombianas NTC* (p. 12). Bogotá: Icontec.

ICONTEC. (2013). Análisis sensorial. In ICONTEC (Ed.), *NormasTecnicas Colombianas NTC* (pp. 2–4). Bogotá.

Indyka, H. E., Williams, J. W., & Patel, H. A. (2008). Analysis of denaturation of bovine IgG by heat and high pressure using an optical biosensor. *International Dairy Journal*, *18*, 359–366. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.10.004

Iorio, M. C., Bevilacqua, A., Corbo, M. R., Campaniello, D., Sinigaglia, M., & Altieri, C. (2018). A case study on the use of ultrasound for the inhibition of Escherichia coli O157:H7 and Listeria monocytogenes in almond milk. *Ultrasonics Sonochemistry*. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.12.026

Jambrak, Lelas, V., Herceg, Z., Mason, T. J., & Paniwnyk, L. (2014). Effect of ultrasound treatment on particle size and molecular weight of whey proteins. *Journal of Food Engineering*, *121*(1), 15–23.

Kariml, D. (2008). Propiedades de geles de concentrado de proteínas de lactosuero, miel y harina, 187.

Karoui, R. (2017). Chapter Seven – Methodologies for the Characterization of the Quality of Dairy Products. In *Advances in Food and Nutrition Research* (Vol. 82, pp. 237–275). https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2016.12.007

Karoui, R., Mouazen, A. M., Dufour, É., Pillonel, L., Picque, D., Bosset, J.-O., & Baerdemaeker, J. De. (2006). Mid-infrared spectrometry: A tool for the determination of chemical parameters in Emmental cheeses produced during winter. *Lait*, *86*(1), 83–97. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374136-3.00010-9

Kaur, B. P., & Rao, P. S. (2017). Modeling the Combined Effect of Pressure and Mild Heat on the Inactivation Kinetics of Escherichia coli , Listeria innocua , and Staphylococcus aureus in Black Tiger Shrimp (Penaeus monodon). *Frontiers in Microbiology*, *8*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01311

Kentish, S., & Ashokkumar, M. (2011). The physical and chemical effects of ultrasound. *Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing*, 1–12. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7472-3_1

Knorr, D., Zenker, M., Heinz, V., & Lee, D. U. (2004). Applications and potential of ultrasonics in food processing. *Trends in Food Science and Technology*, *15*(5), 261–266. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.12.001

Kong, J., & Yu, S. (2007a). Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, *39*, 549–449.

Kong, J., & Yu, S. (2007b). Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *AActa Biochemica et Biophysica (Shanghai)*, *39*, 549–559.

Lefèvre, T., & Subirade, M. (1999). Structural and interaction properties of β-Lactoglobulin as studied by FTIR spectroscopy. *International Journal of Food Science and Technology*, *34*, 419–428.

Leighton, T. G. (1998). An introduction to acoustic cavitation. *Ultrasonics*, (January 1984), 199–223. https://doi.org/10.1088/0022-3735/20/8/001

Leman, J., & Kinsella, J. E. (1989). Surface activity, film formation and emulsifying properties of milk proteins. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *28*(2), 115–138.

Lim, S.-Y., Swanson, B. G., & Clark, S. (2008). High Hydrostatic Pressure Modification of Whey Protein Concentrate for Improved Functional Properties. *Journal of Dairy Science*, *91*, 1299–1307. https://doi.org/10.3168/jds.2007-0390

Lim, S.-Y., Swanson, B. G., Ross, C. F., & Clark, S. (2008). High Hydrostatic Pressure Modification of Whey Protein Concentrate for Improved Body and Texture of Lowfat Ice Cream. *Journal of Dairy Science*, *91*, 1308–1316. https://doi.org/10.3168/jds.2007-0391

Liu, Z., Juliano, P., Williams, R. P. W., Niere, J., & Augustin, M. A. (2014). Ultrasound improves the renneting properties of milk. *Ultrasonics Sonochemistry*, *21*(6), 2131–2137. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.03.034

Livney, Y. D., & Dalgleish, D. G. (2004). Specificity of disulfide bond formation during thermal aggregation in solutions of β-lactoglobulin B and κ-casein A. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*, 5527–5532.

Liyanaarachchi, W. S., Ramchandran, L., & Vasiljevic, T. (2015). Controlling heat induced aggregation of whey proteins by casein inclusion in concentrated protein dispersions. *International Dairy Journal*, *44*, 21–30.

Lopes, R. P., Delgadillo, I., Saraiva, J. A., Gomes, A. M., Pinto, C. A., Lopes da Silva, J. A., … Mota, M. J. (2018). Physicochemical and microbial changes in yogurts produced under different pressure and temperature conditions. *LWT - Food Science and Technology*, *99*(September 2018), 423–430. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.09.074

López-Fandiño, R. (2006). High pressure-induced changes in milk proteins and possible applications in dairy technology. *International Dairy Journal*, *16*, 1119–1131. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.11.007

Lucey, J. A. (2009). Milk protein gels. In B. & S. & Thompson (Ed.), *Milk Proteins:From expressión to food* (pp. 449–472). New Zealand.

Mason, T., O'Donnell, C., Kerry, J., Ojha, K., & Tiwari, B. (2017). Ultrasound technology

for food fermentation applications. *Ultrasonics Sonochemistry*, *34*, 410–417. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.001

McClements, D. J. (1995). Advances in the application of ultrasound in food analysis and processing. *Trends in Food Science & Technology*, *6*, 293–299.

Monteiro, S., Silva, E., Alvarenga, V., Moraes, J., Freitas, M. Q., Silva, M. C., … Cruz, A. (2018). Effects of ultrasound energy density on the non-thermal pasteurization of chocolate milk beverage. *Ultrasonics Sonochemistry*, *42*, 1–10. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.11.015

Montogomery, D. C. (2004). *Diseño y Análisis de Experimentos*. *Limusa Wiley*. https://doi.org/10.1109/RE.2014.6912298

Müller, J. (2017). *¿ Dumas o Kjeldahl para el análisis de referencia ?* Barcelona.

Nakai, S., & Modler, H. (1996). *Food Proteins. Properties and Characterization*. Wiley.

Okpala, C. O. R., Piggott, J. R., & Schaschke, C. J. (2010). Effects of high-pressure processing (HPP) on the microbiological , physicochemical and sensory properties of fresh cheeses : A review. *African Journal of Biotechnology*, *8*(25), 7391–7398.

Olivas, R., Nevárez, G., & Gastélum, M. (2009). Las pruebas de diferencia en el análisis sensorial de los alimentos. *TECNOCIENCIA Chihuahua*, *3*(1), 1–7. Retrieved from http://tecnociencia.uach.mx/numeros/numeros/v3n1/data/AnalisisSensorialdeAlimentos.pdf

Ortega-pérez, D. C., Bustamante-Rua, M. O., Gutiérrez-Rôa, D. F., & Correa-Espinal, A. A. (2015). Mixture experiments in industrial formulations Diseño de mezclas en formulaciones industriales. *DYNA*, *82*(189), 149–156.

Padiernos, C. A., Lim, S.-Y., Swanson, B. G., Ross, C. F., & Clark, S. (2009). High hydrostatic pressure modification of whey protein concentrate for use in low-fat whipping cream improves foaming properties. *Journal of Dairy Science*, *92*, 3049–3056. https://doi.org/10.3168/jds.2008-1997

Paidhungat, M., Setlow, B., Daniels, W. B., Hoover, D., Papafragkou, E., & Setlow, P. (2002). Mechanisms of Induction of Germination of Bacillus subtilis Spores by High Pressure. *Applied and Environmental Microbiology*, *68*(6), 3172–3175. https://doi.org/10.1128/AEM.68.6.3172

Pardo, M. E., & Almanza, F. (2003). Fabricación de algunos tipos de queso. In CAB (Ed.), *Guia de procesos para la elaboración de productos lácteos* (pp. 20–26). Bogotá.

Park, C. B. B. B., & Clark, D. S. (2002). Pressure efects on intra- and intermolecular interactions within proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 235–249.

Patel, H. A., Singh, H., Anema, S. G., & Creamer, L. K. (2006). Effects of Heat and High

Hydrostatic Pressure Treatments on Disulfide Bonding Interchanges among the Proteins in Skim Milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*, 3409–3420. https://doi.org/10.1021/jf052834c

Patel, H. A., Singh, H., Havea, P., Considine, T., & Creamer, L. K. (2005). Pressure-Induced Unfolding and Aggregation of the Proteins in Whey Protein Concentrate Solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*, 9590–9601.

Penna, A., Gurram, S., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2007). High hydrostatic pressure processing on microstructure of probiotic low-fat yogurt. *Food Reseaech International*, *40*, 510–519. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.01.001

Phimolsiripol, Y., & Suppakul, P. (2016). Techniques in Shelf Life Evaluation of Food Products. *Reference Module in Food Science*, (January). https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100596-5.03293-5

Pinillos, J. F., & Lopera, C. . (2009). Elaboración de una formulación farmacéutica a través de un diseño experimental de mezclas. *VITAE*, *16*(3), 338–353.

Pintor, A. M., Hernández, M. Y., Ricaurte, L., Alonso, J., & Cubides, P. (2016). Caracterización Quimico-Energetica de dos variedades de queso fresco,haciendo uso del factor Atuater y calorimetría. *Alimentos Hoy*, *24*(38), 34–61.

Piyasena, P., Mohareb, P., & McKellar, R. (2003). Inactivation of microbes using ultrasound: a review. *International Journal of Food Microbiology*, *87*(3), 207–216.

Potoroko, I., Kalinina, I., Botvinnikova, V., Krasulya, O., Fatkullin, R., Bagale, U., & Sonawane, S. H. (2018). Ultrasound effects based on simulation of milk processing properties. *Ultrasonics Sonochemistry*, *48*(June), 463–472. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.06.019

Puente, E, J., Romero, R., Rodríguez, M. I., & Trejo, H. A. (2005). Aplicación del diseño por mezclas en la industria alimentaria Introducción. *CULCyT/Ingeniería Industrial*, *12*(56).

Rahaman, T., Vasiljevic, T., & Ramchandran, L. (2016). Effect of processing on conformational changes of food proteins related to allergenicity. *Trends in Food Science & Technology*, *49*, 24–34. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.01.001

Rao, M. A. (2007). *Rheology of foof and semisolid foods: Principles and aplication*. (Gustavo V. Barbosa-Canovas, Ed.) (second). Geneva.NY: Springer.

Rasmussen, L., Johnsen, L., Tsiora, A., Sørensen, E. S., Thomsen, J., Nielsen, N. C., … Petersen, T. E. (1999). Disulphide-linked caseins and casein micelles. *International Dairy Journal*, *9*, 215–218.

Regnault, S., Thiebaud, M., Dumay, E., & Cheftel, J. C. (2004). Pressurisation of raw

skim milk and of a dispersion of phosphocaseinate at 9 C or 20 C : effects on casein micelle size distribution. *International Dairy Journal*, *14*, 55–68. https://doi.org/10.1016/S0958-6946(03)00144-4

Rich, L. M., & Foegeding, E. A. (2000). Effects of sugars on whey protein isolate gelation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*, 5046–5052.

Rojas-Castro, W. N., Chacon-Villalobos, A., & Pineda-Castro, M. L. (2007). características del yogurt batido de fresa derivadas de diferentes proporciones de leche de vaca y cabra 1. *Agronomía Mesoamericana*, *18*(2), 221–237.

Rosenthal, A. J. (1992). Relacion entre medidas instrumentales y sensoriales de la textura de alimentos. In *Textura de los Alimentos, Medida y percepción* (pp. 1–18). Zaragoza (España): Editorial Acribia,S.A.

Royer, C. A. (2002). Revisiting volume changes in pressure-induced protein unfolding. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1595*, 201–209.

Sáyago-Ayerdi, S. G., Vaquero, M. P., Schultz-Moreira, A., Bastida, S., & Sánchez-Muniz, F. J. (2008). Utilidad y controversias del consumo de ácidos grasos de cadena media sobre el metabolismo lipoproteico y obesidad. *Nutricion Hospitalaria*, *23*(3), 191–202.

Shanmugam, Chandrapala, J., & Ashokkumar, M. (2012). The effect of ultrasound on the physical and functional properties of skim milk. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *16*, 251–258. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ifset.2012.06.005

Silva, M., Zisu, B., & Chandrapala, J. (2018). Influence of low-frequency ultrasound on the physico-chemical and structural characteristics of milk systems with varying casein to whey protein ratios. *Ultrasonics Sonochemistry*, *49*, 268–276. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.08.015

Soteras, E. M., Gil, J., Yacanto, P., Muratona, S., Abaca, C., & Sustersic, M. G. (2014). Isotermas de adsorción y desorción de agua en leche n polvo:II.Leche entera. *Avances En Ciencia e Ingeniería*, *5*(1), 57–66. Retrieved from https://www.redalyc.org/html/3236/323630173006/

Steffe, J. F. (1996a). *Rheological methods in food process engineering*. (Freeman press, Ed.) (second edi). East Lansing Mi.-USA.

Steffe, J. F. (1996b). Viscoelasticity. In Freeman press (Ed.), *Rheological methods in food process engineering* (second, pp. 294–348).

Subirade, M., Loupil, F., Allain, A., & Paquin, P. (1998). Effect of Dynamic High Pressure on the Secondary Structure of -Lactoglobulin and on its Conformational Properties as Determined by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *International Dairy Journal*, *6946*(98), 135–140.

Tanaka, T., & Hatanaka, K. (1992). Aplication of hyidrostatic pressure to yogurt to prevent its after-acidification. *Journal Jpn Soc.Food Sci. Technol.*, *39*, 173–177.

Téllez, S. J., Ramírez, J. A., Pérez, C., Vázquez, M., & Simal, J. (2001). Application of high hydrostatic pressure in the food preservation. *CyTA - Journal of Food*, *3*(2), 66–80. https://doi.org/10.1080/11358120109487649

Thompson, B. & S. &. (2014). *Milk Proteins, 2nd Edition From Expression to Food*. (I. S. Food Science and Technology, Ed.). New Zealand: Elsevier. Retrieved from http://store.elsevier.com/Milk-Proteins/isbn-9780124051751/

Valente-Mesquita, V. L., Botelho, M. M., & Ferreira, S. T. (1998). Pressure-Induced Subunit Dissociation and Unfolding of Dimeric β-Lactoglobulin. *Biophysical Journal*, *75*, 471–476. https://doi.org/10.1016/S0006-3495(98)77535-6

van Vliet, T., van Dijk, H., Zoon, P., & Walstra, P. (1991). Relation between syneresis and rheological properties of particle gels. *Colloid and Polymer Science*, *269*(6), 620–627.

Vernaza, M. G., Castillo-Pizarro, C., Bolini, H. M. A., Santos, L. C. S., Elias, E. M., Silva, C. B., … Zepka, L. Q. (2006). Perfil sensorial de iogurte light, sabor pêssego. *Ciência e Tecnologia de Alimentos,Campinas*, *26*(3), 619–625. https://doi.org/10.1590/s0101-20612006000300021

Walstra, P., Geurts, T. J., Noomen, A., Jellema, M., & Van Boekel, M. (2001). Quesos. In Editorial ACRIBIA (Ed.), *Ciencia de la Leche y Tecnología de los productos Lácteos* (pp. 545–606). Zaragoza(España).

Wijayanti, H. B., Bansal, N., & Deeth, H. C. (2014). Stability of Whey Proteins during Thermal Processing: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12105

Yang, B., Shi, Y., Xia, X., Xi, M., Wang, X., Ji, B., & Meng, J. (2012). Inactivation of foodborne pathogens in raw milk using high hydrostatic pressure. *Food Control*, *28*, 273–278. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.04.030

Yang, Dunker, A. K., Powers, J. R., Clark, S., & Swanson, B. G. (2001). B-Lactoglobulin Molten Globule Induced by High Pressure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*, 3236–3243.

Zhao, L., Zhang, S., Uluko, H., Liu, L., Lu, J., Xue, H., … Lv, J. (2014). Effect of ultrasound pretreatment on rennet-induced coagulation properties of goat's milk. *Food Chemistry*, *165*, 167–174. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.081

Zhi, N.-N., Zong, K., Thakur, K., Qu, J., Shi, J.-J., Yang, J.-L., & Wei, J. Y. & Z.-J. (2017). Development of a dynamic prediction model for shelf-life evaluation of yogurt by

using physicochemical, microbiological and sensory parameters. *CyTA - Journal of Food*, *16*(1), 42–49. https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1336572

Zisu, B., Bhaskaracharya, R., Kentish, S., & Ashokkumar, M. (2010). Ultrasonic processing of dairy systems in large scale reactors. *Ultrasonics Sonochemistry*, *17*, 1075–1081. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2009.10.014

Zobrist, M. R., Huppertz, T., Uniacke, T., Fox, P. F., & Kelly, A. L. (2005). High-pressure-induced changes in the rennet coagulation properties of bovine milk. *International Dairy Journal*, *15*, 655–662. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.07.025

Anexo Estadístico General

ANEXO ESTADÍSTICO GENERAL

Tabla de contenido

1 Anexo estadístico Capítulo 3 206
1.1 Análisis estadístico tratamiento por HHP 206
1.1.1 Rendimiento quesero 206
1.1.2 Humedad coagulo 208
1.1.3 Análisis estadístico Textura 211
1.1.4 Hidrofobicidad 222
1.1.5 Tamaño de partícula 225
1.1.6 Valor de pH 227
1.2 Análisis estadístico tratamiento con ultrasonido 230
1.2.1 Rendimiento 230
1.2.2 Humedad 233
1.2.3 Análisis estadístico textura 236
1.2.4 Tamaño de particula 253
1.2.5 Hidrofobicidad-Leche 256
1.2.6 Sineresis 261
1.2.7 Color 264
1.2.8 VALOR DE pH 267

2 Anexo estadístico Capítulo 4 271
2.1 Analisis estadistico proceso de fermentación 271
2.1.1 Producción de ácido láctico en fermentación petiti suis 271
2.1.2 Parámetros weibull –Alfa 272
2.1.3 Parámetro Weibull- Beta 275
***2.1.1.* Parámetros Weltmann- A 278**
2.1.4 Parametro Weltmann B textura 279
2.2 Analisis etadistico formulaciones teoria de mezclas 282
2.2.1 Aceptación sensorial 282
2.2.2 Calificación promedio 285
2.2.3 Color 288
2.2.4 Aroma 291
2.2.5 Sabor 294
2.2.6 Textura 297
2.2.7 Dulzor 300

3 Anexo estadístico capítulo 5 302
3.1 Estadística comportamiento reológico de geles de WPI 302
3.1.1 Estadísticos para G* 302
3.1.2 Estadísticos para G´ 303
3.1.3 Estadísticos para G´´ 305
3.2 Estadística comportamiento reológico de geles de WPC 306
3.2.1 Estadísticos para G´ de WPC 306
3.2.2 Estadísticos para G´´ 308
3.2.3 Estadísticos para G* 309

1 Anexo estadístico Capítulo 3

1.1 Análisis estadístico tratamiento por HHP

1.1.1 Rendimiento quesero

Term	DOF	SumSqr	MeanSqr	F Value	Prob>F	% Contribtn
Intercept						
A	2	0.00188046	0.000940232	< 0.0001		93.0612
B	1	0.000337831	0.000337831	< 0.0001		33.4375
AB	2	2.12244E-006	1.06122E-006	0.9011		0.105036
Lack Of Fit	0	0				0
Pure Error	12	0.000121241				5.17755
Residuals	12	0.000121241	1.01034E-005			

Use your mouse to right click on individual cells for definitions.

Response: Rendimiento

ANOVA for Selected Factorial Model

Analysis of variance table [Partial sum of squares]

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F
Model	0.000	0			
Residual	2.342E-003	17	1.377E-004		
Lack of Fit	*2.220E-003*	*5*	*4.441E-004*	*43.95*	*< 0.0001 significant*
Pure Error	*1.212E-004*	*12*	*1.010E-005*		
Cor Total	2.342E-003	17			

The "Lack of Fit F-value" of 43.95 implies the Lack of Fit is significant. There is only a 0.01% chance that a "Lack of Fit F-value" this large could occur due to noise. Significant lack of fit is bad -- we want the model to fit.

Std. Dev.	0.012	R-Squared	0.0000
Mean	0.11	Adj R-Squared	0.0000
C.V.	10.38	Pred R-Squared	-0.1211
PRESS	2.625E-003	Adeq Precision	

A negative "Pred R-Squared" implies that the overall mean is a better predictor of your response than the current model.

Coefficient		Standard	95% CI	95% CI

Term	Estimate	DF	Error	Low	High
Intercept	0.11	1	2.766E-003	0.11	0.12

Final Equation in Terms of Coded Factors:

Rendimiento = +0.11

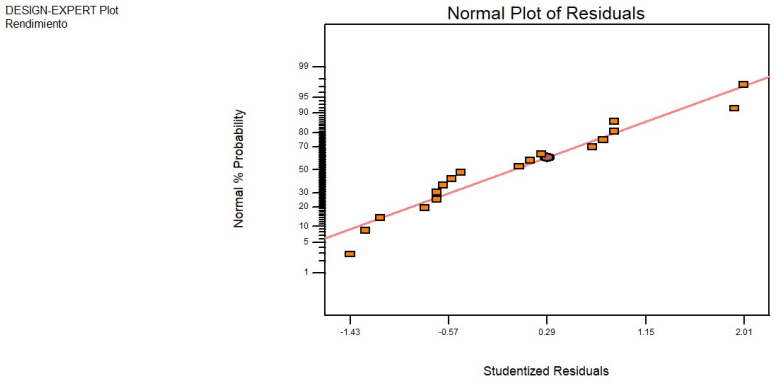
Final Equation in Terms of Actual Factors:

Rendimiento = +0.11304

Diagnostics Case Statistics

Run Order	Standard Order	Actual Value	Predicted Value	Residual	Leverage	Student Residual	Cook's Distance	Outlier
1	7	0.097	0.11	-0.016	0.056	-1.428	0.120	-1.477
2	17	0.098	0.11	-0.015	0.056	-1.297	0.099	-1.325
3	2	0.100	0.11	-0.013	0.056	-1.165	0.080	-1.178
4	3	0.11	0.11	-7.668E-003	0.056	-0.672	0.027	-0.661
5	11	0.11	0.11	-6.168E-003	0.056	-0.541	0.017	-0.529
6	12	0.11	0.11	-7.668E-003	0.056	-0.672	0.027	-0.661
7	8	0.12	0.11	0.010	0.056	0.882	0.046	0.876
8	5	0.12	0.11	8.961E-003	0.036	0.776	0.056	0.786
9	18	0.12	0.11	7.861E-003	0.028	0.678	0.056	0.689
10	16	0.10	0.11	-8.839E-003	0.056	-0.775	0.035	-0.765
11	13	0.11	0.11	-7.039E-003	0.056	-0.617	0.022	-0.606
12	14	0.11	0.11	-5.239E-003	0.056	-0.459	0.012	-0.448
13	15	0.11	0.11	5.672E-004	0.048	0.050	0.000	0.050
14	4	0.11	0.11	1.667E-003	0.142	0.146	0.001	0.146
15	9	0.12	0.11	2.767E-003	0.236	0.243	0.003	0.243
16	10	0.12	0.11	0.010	0.056	0.882	0.046	0.876

0.876	6					
17	0.14	0.11	0.022	0.056	1.935	0.220
2.125	10					
18	0.14	0.11	0.023	0.056	2.014	0.239
2.240	1					



1.1.2 Humedad coagulo

		Term	DOF	SumSqr	MeanSqr	F
Value	Prob>F	%				Contribtn
Require	Intercept					
Error	A	2	0.0168654	0.0084327	0.0001	
21.5076	63.516					
Error	B	1	0.00234841	0.00234841	0.0307	
5.98961	8.84424					
Error	AB	2	0.00263422	0.00131711	0.0694	
3.35928	9.92061					
Error	Lack					Of
Fit	0	0				0
Error	Pure					
Error	12	0.00470497				
17.7192						
	Residuals	12	0.00470497	0.000392081		

Use your mouse to right click on individual cells for definitions.

Response: Humedad

ANOVA for Selected Factorial Model

Analysis of variance table [Partial sum of squares]

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F
Model	0.000	0			
Residual	0.027	17	1.562E-003		
Lack of Fit	*0.022*	*5*	*4.370E-003*	*11.14*	*0.0004* *significant*
Pure Error	*4.705E-003*	*12*	*3.921E-004*		

Cor Total	0.027	17

The "Lack of Fit F-value" of 11.14 implies the Lack of Fit is significant. There is only a 0.04% chance that a "Lack of Fit F-value" this large could occur due to noise.

Significant lack of fit is bad -- we want the model to fit.

	Std. Dev.	0.040		R-Squared	0.0000
	Mean	0.54	Adj R-Squared	0.0000
	C.V.	7.25	Pred R-Squared	-0.1211
	PRESS	0.030		Adeq Precision	

A negative "Pred R-Squared" implies that the overall mean is a better predictor of your response than the current model.

Term	Coefficient Estimate	DF	Standard Error	95% CI Low	95% CI High
Intercept	0.54	1	9.315E-003	0.53	0.56

Final Equation in Terms of Coded Factors:

Humedad =
+0.54

Final Equation in Terms of Actual Factors:

Humedad =
+0.54484

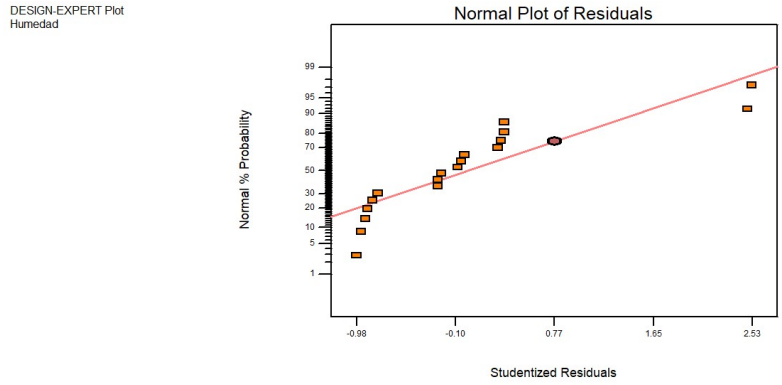
Diagnostics Case Statistics

Run Order	Standard Order	Actual Value	Predicted Value	Residual	Leverage	Student Residual	Cook's Distance	Outlier t
1	7	0.51	0.54	-0.038	0.056	-0.983	0.057	-0.982

2	0.51	0.54	-0.036	0.056	-		
0.944	0.052	-0.940	2				
3	0.51	0.54	-0.035	0.056	-		
0.905	0.048	-0.900	3				
4	0.53	0.54	-9.944E-003	0.056	-		
0.259	0.004	-0.252	17				
5	0.54	0.54	-8.844E-003	0.056	-		
0.230	0.003	-0.224	11				
6	0.53	0.54	-9.944E-003	0.056	-		
0.259	0.004	-0.252	12				
7	0.56	0.54	0.013	0.056	0.330	0.006	
0.321	8						
8	0.56	0.54	0.012	0.056	0.301	0.005	
0.293	5						
9	0.56	0.54	0.010	0.056	0.272	0.004	
0.265	18						
10	0.51	0.54	-0.034	0.056	-		
0.886	0.046	-0.881	16				
11	0.51	0.54	-0.032	0.056	-		
0.840	0.041	-0.832	13				
12	0.51	0.54	-0.030	0.056	-		
0.793	0.037	-0.784	14				
13	0.54	0.54	-3.144E-003	0.056	-		
0.082	0.000	-0.079	15				
14	0.54	0.54	-2.044E-003	0.056	-		
0.053	0.000	-0.052	4				
15	0.54	0.54	-9.444E-004	0.056	-		
0.025	0.000	-0.024	9				
16	0.56	0.54	0.013	0.056	0.330	0.006	
0.321	6						
17	0.64	0.54	0.096	0.056	2.493	0.366	
3.037	10						
18	0.64	0.54	0.097	0.056	2.532	0.377	
3.113	1						

If all the model statistics and diagnostic plots are OK, finish up with the Model Graphs

icon.



1.1.3 Análisis estadístico Textura

1.1.3.1 Dureza

ANOVA for Selected Factorial Model
Analysis of variance table [Partial sum of squares]

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F	
Model	0.000	0				
Residual	235.45	17	13.85			
Lack of Fit	*208.19*	*5*	*41.64*	*18.33*	*< 0.0001*	*significant*
Pure Error	*27.26*	*12*	*2.27*			
Cor Total	235.45	17				

The "Lack of Fit F-value" of 18.33 implies the Lack of Fit is significant. There is only a 0.01% chance that a "Lack of Fit F-value" this large could occur due to noise. Significant lack of fit is bad -- we want the model to fit.

Std. Dev.	3.72	R-Squared	0.0000
Mean	9.09	Adj R-Squared	0.0000
C.V.	40.95	Pred R-Squared	-0.1211

PRESS 263.97 Adeq Precision

A negative "Pred R-Squared" implies that the overall mean is a better predictor of your response than the current model.

Term	Coefficient Estimate	DF	Standard Error	95% CI Low	95% CI High
Intercept	9.09	1	0.88	7.24	10.94

Final Equation in Terms of Coded Factors:

Dureza = +9.09

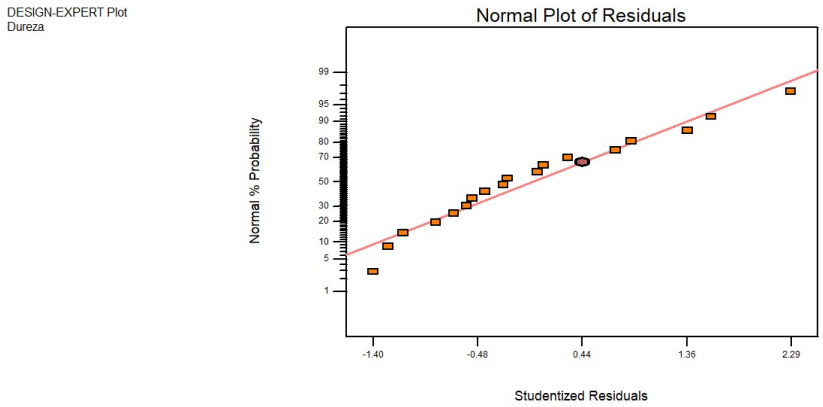
Final Equation in Terms of Actual Factors:

Dureza = +9.08833

Diagnostics Case Statistics

Standard Order	Actual Value	Predicted Value	Residual	Leverage	Student Residual	Cook's Distance	Outlier Run Order
1	12.26	9.09	3.17	0.056	0.877	0.045	0.871	7
2	14.81	9.09	5.72	0.056	1.582	0.147	1.662	2
3	17.36	9.09	8.27	0.056	2.287	0.308	2.667	3
4	8.31	9.09	-0.78	0.056	-0.215	0.003	-0.209	17
5	9.27	9.09	0.18	0.056	0.050	0.000	0.049	11
6	10.23	9.09	1.14	0.056	0.316	0.006	0.307	12
7	7.18	9.09	-1.91	0.056	-0.528	0.016	-0.516	8
8	6.60	9.09	-2.49	0.056	-0.688	0.028	-0.677	5
9	6.02	9.09	-3.07	0.056	-0.848	0.042	-0.841	18
10	9.46	9.09	0.37	0.056	0.103	0.001	0.100	16
11	11.76	9.09	2.67	0.056	0.739	0.032	0.728	13
12	14.06	9.09	4.97	0.056	1.375	0.111	1.415	14
13	7.00	9.09	-2.09	0.056	-0.577	0.020	-0.566	15
14	7.59	9.09	-1.50	0.056	-0.414	0.010	-0.404	4
15	8.18	9.09	-0.91	0.056	-0.251	0.004	-0.244	9
16	4.98	9.09	-4.11	0.056	-1.136	0.076	-1.146	6
17	4.02	9.09	-5.07	0.056	-1.401	0.116	-1.446	10
18	4.50	9.09	-4.59	0.056	-1.269	0.095	-1.294	1

If all the model statistics and diagnostic plots are OK, finish up with the Model Graphs icon.



1.1.3.2 Elasticidad

Term	DOF	SumSqr	MeanSqr	F Value	Prob>F	% Contribtn
Require	Intercept					
Error	A	2	11.8814	5.94071	0.0007	13.9725
28.8347						
Error	B	1	2.15627	2.15627	0.0438	5.07153
5.233						
Error	AB	2	22.0655	11.0328	< 0.0001	25.9489
53.5503						
Error	Lack Of Fit	0	0		0	
Error	Pure Error	12	5.10207			12.3821
	Residuals	12	5.10207	0.425172		

Use your mouse to right click on individual cells for definitions.
Response: Elasticidad
ANOVA for Selected Factorial Model
Analysis of variance table [Partial sum of squares]

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F
Model	0.000	0			

Residual	41.21	17	2.42			
Lack of Fit	*36.10*	*5*	*7.22*	*16.98*	*< 0.0001*	*significant*
Pure Error	*5.10*	*12*	*0.43*			
Cor Total	41.21	17				

Std. Dev.	1.56	R-Squared	0.0000
Mean	6.63	Adj R-Squared	0.0000
C.V.	23.48	Pred R-Squared	-0.1211
PRESS	46.20	Adeq Precision	

Coefficient Term	Estimate	DF	Standard Error	95% CI Low	95%CI High
Intercept	6.63	1	0.37	5.86	7.40

Final Equation in Terms of Coded Factors:

Elasticidad =
+6.63

Final Equation in Terms of Actual Factors:

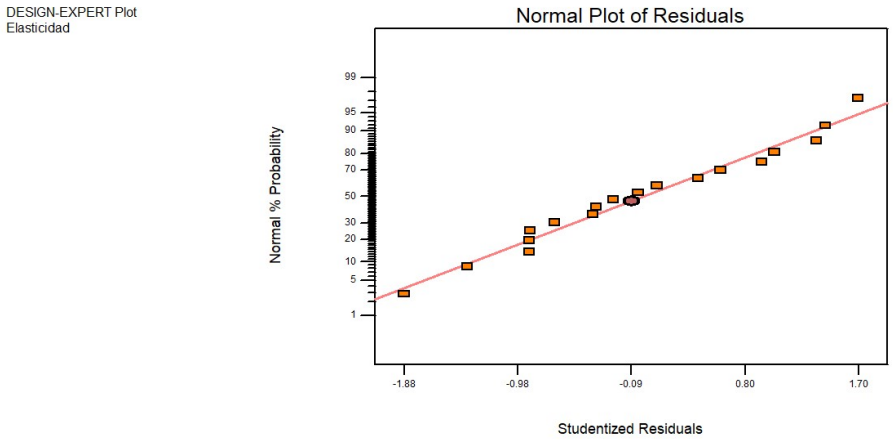
Elasticidad =
+6.63056

Diagnostics Case Statistics

Standard Order	Actual Value	Predicted Value	Residual	Leverage	Student Residual	Cook's Distance	Outlier Run Order
1	3.79	6.63	-2.84	0.056	-1.877	0.207	-2.046 7
2	4.54	6.63	-2.09	0.056	-1.382	0.112	-1.423 2
3	5.29	6.63	-1.34	0.056	-0.886	0.046	-0.880 3
4	5.28	6.63	-1.35	0.056	-0.893	0.047	-0.887 17
5	6.28	6.63	-0.35	0.056	-0.232	0.003	-0.225 11
6	5.28	6.63	-1.35	0.056	-0.893	0.047	-0.887 12
7	9.20	6.63	2.57	0.056	1.698	0.170	1.808 8
8	8.70	6.63	2.07	0.056	1.368	0.110	1.407 5

9	8.20	6.63	1.57	0.056	1.037	0.063	1.040	18
10	7.29	6.63	0.66	0.056	0.436	0.011	0.425	16
11	8.05	6.63	1.42	0.056	0.938	0.052	0.935	13
12	8.81	6.63	2.18	0.056	1.440	0.122	1.491	14
13	5.58	6.63	-1.05	0.056	-0.694	0.028	-0.683	15
14	6.08	6.63	-0.55	0.056	-0.364	0.008	-0.354	4
15	6.58	6.63	-0.051	0.056	-0.033	0.000	-0.032	9
16	7.56	6.63	0.93	0.056	0.614	0.022	0.603	6
17	6.04	6.63	-0.59	0.056	-0.390	0.009	-0.380	10
18	6.80	6.63	0.17	0.056	0.112	0.001	0.109	1

If all the model statistics and diagnostic plots are OK, finish up with the Model Graphs icon.



Adhesividad

Term	DOF	SumSqr	MeanSqr	F	Value	Prob>F	% Contribtn	Require
Intercept								
A	2	0.0161778	0.00808889	0.0007				
14.3194	52.4009							
B	1	0.000938889	0.000938889	0.2216				
1.66208	3.04112							
AB	2	0.00697778	0.00348889	0.0143				
6.17624	22.6015							
	21.9565							
Residuals	12	0.00677867	0.000564889					

Use your mouse to right click on individual cells for definitions.

Response: Adhesividad

ANOVA for Selected Factorial Model

Analysis of variance table [Partial sum of squares]

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F
Model	0.000	0			
Residual	0.031	17	1.816E-003		
Std. Dev.	0.043		R-Squared	0.0000	
Mean	-0.23		Adj R-Squared	0.0000	
C.V.	-18.75		Pred R-Squared	-0.1211	
PRESS	0.035		Adeq Precision		

Term	Coefficient Estimate	DF	Standard Error	95% CI Low	95% CI High
Intercept	-0.23	1	0.010	-0.25	-0.21

Final Equation in Terms of Coded Factors:

Adhesividad = -0.23

Final Equation in Terms of Actual Factors:

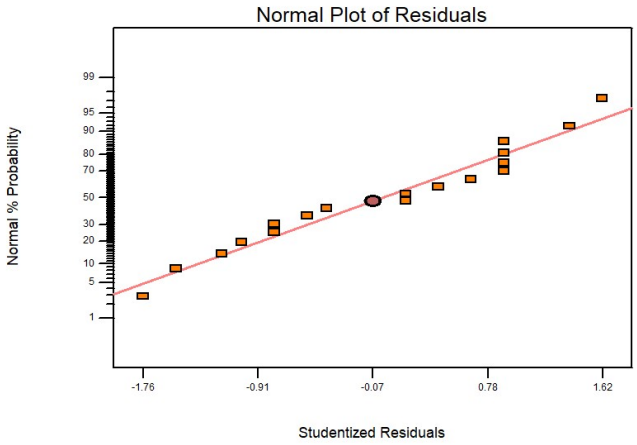
Adhesividad = -0.22722

Diagnostics Case Statistics

Run Order	Standard Order	Actual Value	Predicted Value	Residual	Leverage	Student Residual	Cook's Distance	Outlier
1	7	-0.30	-0.23	-0.073	0.056	-1.757	0.182	-1.885
2	2	-0.26	-0.23	-0.033	0.056	-0.791	0.037	-0.782
3	3	-0.22	-0.23	7.222E-003	0.056	0.174	0.002	0.169
4	4	-0.19	-0.23	0.037	0.056	0.899	0.048	0.893

	5	-0.17	-			
0.23	0.057	0.056	1.382	0.112	1.423	11
	6	-0.19	-			
0.23	0.037	0.056	0.899	0.048	0.893	12
	7	-0.24	-0.23	-0.017	0.056	-
0.405	0.010	-0.395	8			
	8	-0.26	-0.23	-0.033	0.056	-
0.791	0.037	-0.782	5			
	9	-0.28	-0.23	-0.049	0.056	-
1.178	0.082	-1.192	18			
	10	-0.22	-0.23	7.222E-		
003	0.056	0.174	0.002	0.169	16	
	11	-0.19	-			
0.23	0.037	0.056	0.899	0.048	0.893	13
	12	-0.16	-			
0.23	0.067	0.056	1.623	0.155	1.713	14
	13	-0.21	-			
0.23	0.017	0.056	0.416	0.010	0.406	15
	14	-0.20	-			
0.23	0.027	0.056	0.657	0.025	0.646	4
	15	-0.19	-			
0.23	0.037	0.056	0.899	0.048	0.893	9
	16	-0.25	-0.23	-0.023	0.056	-
0.550	0.018	-0.538	6			
	17	-0.29	-0.23	-0.063	0.056	-
1.516	0.135	-1.581	10			
	18	-0.27	-0.23	-0.043	0.056	-
1.033	0.063	-1.035	1			

DESIGN-EXPERT Plot
Adhesividad



1.1.3.3 Cohesividad

Term	DOF	SumSqr	MeanSqr	F	Value	Prob>F
% Contribtn						
Require	Intercept					
Error	A	2	0.0494111	0.0247056	<	0.0001
46.8105	13.1473					
Error	B	1	0.301606	0.301606	<	0.0001
571.463	80.251					
Error	AB	2	0.0184778	0.00923889	0.0003	
17.5053	4.91655					
Error	Lack					Of
Fit	0	0				0
Error	Pure					
Error	12	0.00633333				
1.68517						
	Residuals	12	0.00633333	0.000527778		

Use your mouse to right click on individual cells for definitions.

Response: Cohesividad

ANOVA for Selected Factorial Model

Analysis of variance table [Partial sum of squares]

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F
Model	0.000	0			
Residual	0.38	17	0.022		

Std. Dev.	0.15			R-Squared	0.0000
Mean	0.39		Adj R-Squared	0.0000
C.V.	38.51		Pred R-Squared	-0.1211
PRESS	0.42			Adeq Precision	

Term	Coefficient Estimate	DF	Standard Error	95% CI Low	95% CI

High

Intercept	0.39	1	0.035	0.31	0.46

Final Equation in Terms of Coded Factors:

Cohesividad = +0.39

Final Equation in Terms of Actual Factors:

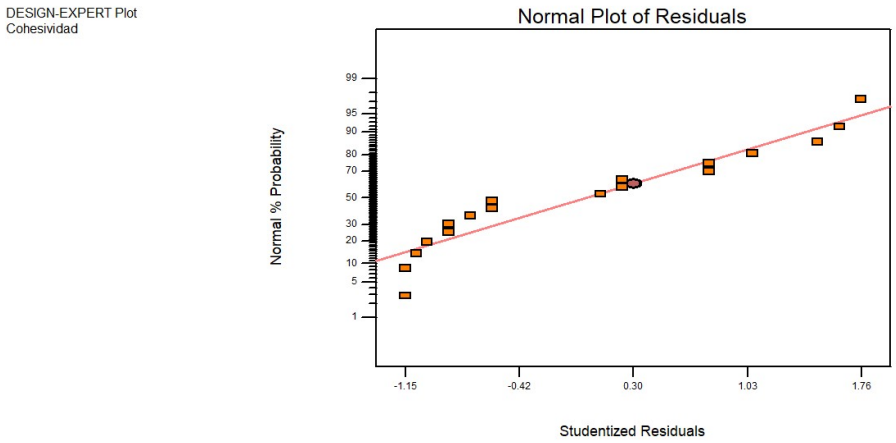
Cohesividad = +0.38611

Diagnostics Case Statistics

Run Order	Standard Order	Actual Value	Predicted Value	Residual	Leverage	Student Residual	Cook's Distance	Outlier
1	7	0.60	0.39	0.21	0.056	1.480	0.129	1.539
2	2	0.62	0.39	0.23	0.056	1.619	0.154	1.707
3	3	0.64	0.39	0.25	0.056	1.757	0.182	1.884
4	17	0.50	0.39	0.11	0.056	0.788	0.037	0.779
5	11	0.54	0.39	0.15	0.056	1.065	0.067	1.069
6	12	0.50	0.39	0.11	0.056	0.788	0.037	0.779
7	8	0.42	0.39	0.034	0.056	0.235	0.003	0.228
8	5	0.40	0.39	0.014	0.056	0.096	0.001	0.093
9	18	0.42	0.39	0.034	0.056	0.235	0.003	0.228
10	16	0.26	0.39	-0.13	0.056	-0.866	0.045	0.873
11	13	0.28	0.39	-0.11	0.056	-0.724	0.032	0.734
12	14	0.30	0.39	-0.086	0.056	-0.584	0.021	0.596
13	15	0.22	0.39	-0.17	0.056	-1.161	0.078	1.150
14	4	0.26	0.39	-0.13	0.056	-0.866	0.045	0.873
15	9	0.30	0.39	-0.086	0.056	-0.584	0.021	0.596
16	6	0.24	0.39	-0.15	0.056	-1.012	0.060	1.011

	17	0.22	0.39	-0.17	0.056	-
1.150	0.078	-1.161	10			
	18	0.23	0.39	-0.16	0.056	-
1.080	0.069	-1.086	1			

Proceed to Diagnostic Plots (the next icon in progression). Be sure to look at the:



1.1.3.4 Masticabilidad

Term	DOF	SumSqr	MeanSqr	F	Value	Prob>F
% Contribtn						
Require	Intercept					
Error	A	2	15.5509	7.77543	<	0.0001
37.4081	81.2787					
Error	B	1	0.824328	0.824328	0.0697	
3.9659	4.30846					
Error	AB	2	0.263316	0.131658	0.5476	
0.633415	1.37626					
Error	Lack					Of
Fit	0	0				0
Error	Pure					
Error	12	2.49425				
13.0365						
	Residuals	12	2.49425	0.207854		

Response: Masticabilidad

ANOVA for Selected Factorial Model
Analysis of variance table [Partial sum of squares]

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F
Model	0.000	0			
Residual	19.13	17	1.13		
Std. Dev.	1.06	R-Squared	0.0000		
Mean	2.10	Adj R-Squared	0.0000		
C.V.	50.43	Pred R-Squared	-0.1211		
PRESS	21.45	Adeq			
Precision					

Coefficient Term	Estimate	Standard DF	Error	95% CI Low	95% CI High
Intercept	2.10	1	0.25	1.58	2.63

Final Equation in Terms of Coded Factors:

Masticabilidad = +2.10

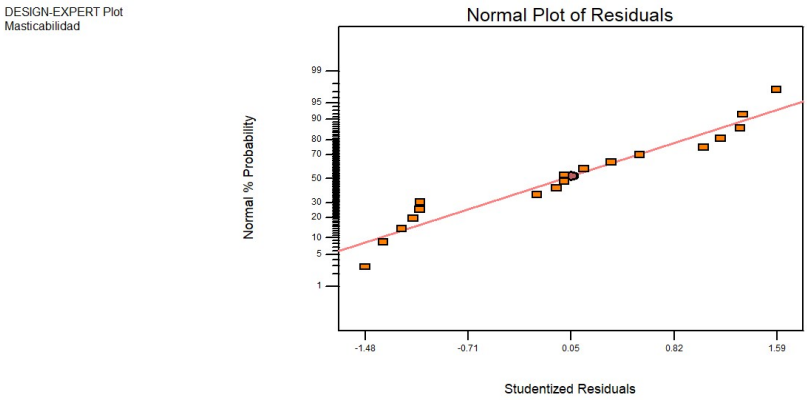
Final Equation in Terms of Actual Factors:

Masticabilidad = +2.10367

Diagnostics Case Statistics

Run Order	Standard Order	Actual Value	Predicted Value	Residual	Leverage	Student Residual	Cook's Distance	Outlier
1	7	3.18	2.10	1.08	0.056	1.044	0.064	1.047
2	2	3.46	2.10	1.36	0.056	1.316	0.102	1.347
3	3	3.74	2.10	1.64	0.056	1.587	0.148	1.668
4	6	2.11	2.10	6.333E-003	0.056	0.006	0.000	0.006
5	11	3.31	2.10	1.21	0.056	1.170	0.081	1.184
6	12	2.11	2.10	6.333E-003	0.056	0.006	0.000	0.006
7	8	1.00	2.10	-1.10	0.056	-1.068	0.067	-1.072
8	5	1.00	2.10	-1.11	0.056	-1.072	0.068	-1.078
9	18	0.95	2.10	-1.16	0.056	-1.121	0.074	-1.130
10	16	1.90	2.10	-0.20	0.056	-0.198	0.002	-0.192
11	13	2.69	2.10	0.59	0.056	0.569	0.019	0.557
12	14	3.48	2.10	1.38	0.056	1.335	0.105	1.369
13	15	2.05	2.10	-0.054	0.056	-0.052	0.000	-0.051
14	4	2.26	2.10	0.16	0.056	0.152	0.001	0.147

	15	2.47	2.10	0.37	0.056	0.355	0.007
	0.346	9					
	16	0.86	2.10	-1.24	0.056	-	
1.207	0.086	-1.225	6				
	17	0.58	2.10	-1.52	0.056	-	
1.479	0.129	-1.537	10				
	18	0.72	2.10	-1.38	0.056	-	
1.343	0.106	-1.378	1				



1.1.4 Hidrofobicidad

	Term	DOF	SumSqr	MeanSqr	F	Value
Prob>F	%					Contribtn
Require	Intercept					
Error	A	2	18896.2	9448.1	<	0.0001
17805.7	92.0847					
Error	B	1	1474.97	1474.97	<	0.0001
2779.7	7.1878					
Error	AB	2	142.915	71.4577	<	0.0001
134.668	0.696453					
Error	Lack					Of
Fit	0	0				0
Error	Pure					
Error	12	6.36747				
0.0310299						
	Residuals	12	6.36747	0.530622		

Response: Hidrofobicidad

ANOVA for Selected Factorial Model

Analysis of variance table [Partial sum of squares]

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F
Model	0.000	0			
Residual	20520.45	17	1207.09		

Std. Dev.	34.74	R-Squared	0.0000
Mean	109.46	Adj R-Squared	0.0000
C.V.	31.74	Pred R-Squared	-0.1211
PRESS	23005.62	Adeq Precision	

Coefficient Term	Estimate	DF	Standard Error	95% CI Low	95% CI High
Intercept	109.46	1	8.19	92.18	126.74

Final Equation in Terms of Coded Factors:

Hidrofobicidad =
+109.46

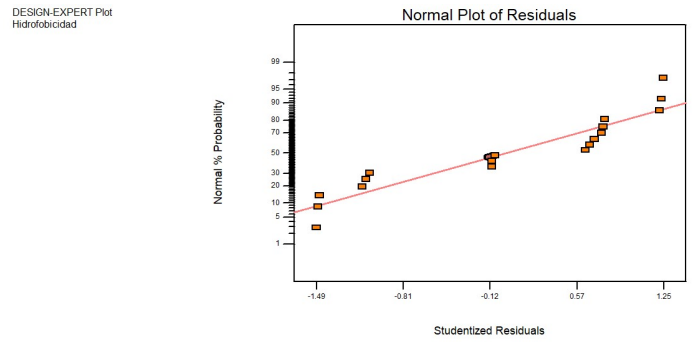
Final Equation in Terms of Actual Factors:

Hidrofobicidad =
+109.46111

Diagnostics Case Statistics

Run Order	Standard Order	Actual Value	Predicted Value	Residual	Leverage	Student Residual	Cook's Distance	Outlier t
1	7	59.03	109.46	-50.43	0.056	-1.555	0.131	-1.494
2	2	59.43	109.46	-50.03	0.056	-1.540	0.129	-1.482
3	3	59.83	109.46	-49.63	0.056	-1.526	0.127	-1.470
4	17	105.90	109.46	-3.56	0.056	-0.102	0.001	-0.105
5	11	106.70	109.46	-2.76	0.056	-0.079	0.000	-0.082

	6	105.90	109.46	-3.56	0.056	-	
0.105	0.001	-0.102	12				
	7	136.03	109.46	26.57	0.056	0.787	0.036
	0.778	8					
	8	135.63	109.46	26.17	0.056	0.775	0.035
	0.766	5					
	9	135.23	109.46	25.77	0.056	0.763	0.034
	0.753	18					
	10	71.27	109.46	-38.19	0.056	-	
1.131	0.075	-1.141	16				
	11	72.25	109.46	-37.21	0.056	-	
1.102	0.071	-1.110	13				
	12	73.23	109.46	-36.23	0.056	-	
1.073	0.068	-1.078	14				
	13	130.88	109.46	21.42	0.056	0.634	0.024
	0.623	15					
	14	132.08	109.46	22.62	0.056	0.670	0.026
	0.659	4					
	15	133.28	109.46	23.82	0.056	0.705	0.029
	0.695	9					
	16	151.71	109.46	42.25	0.056	1.251	0.092
	1.274	6					
	17	150.71	109.46	41.25	0.056	1.222	0.088
	1.241	10					
	18	151.21	109.46	41.75	0.056	1.236	0.090
	1.257	1					



1.1.5 Tamaño de partícula

Term	DOF	SumSqr	MeanSqr	F Value	Prob>F
%	Require	Intercept			
Error	A	2	5221.04	2610.52	0.0028
9.9686	54.5598				
Error	B	1	633.799	633.799	0.1457
2.42024	6.62318				
Error	AB	2	572.069	286.035	0.3666
1.09226	5.97811				

Use your mouse to right click on individual cells for definitions.

Response: Tamaño

ANOVA for Selected Factorial Model

Analysis of variance table [Partial sum of squares]

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F
Model	0.000	0			
Residual	9569.40	17	562.91		
Std. Dev.	23.73		R-Squared	0.0000	
Mean	220.54		Adj R-Squared	0.0000	
C.V.	10.76		Pred R-Squared	-0.1211	
PRESS	10728.32			Adeq Precision	

A negative "Pred R-Squared" implies that the overall mean is a better predictor of your response than the current model.

Term	Coefficient Estimate	DF	Standard Error	95% CI Low	95% CI High
Intercept	220.55	1	5.59	208.75	232.34

Final Equation in Terms of Coded Factors:

Tamaño =
+220.55

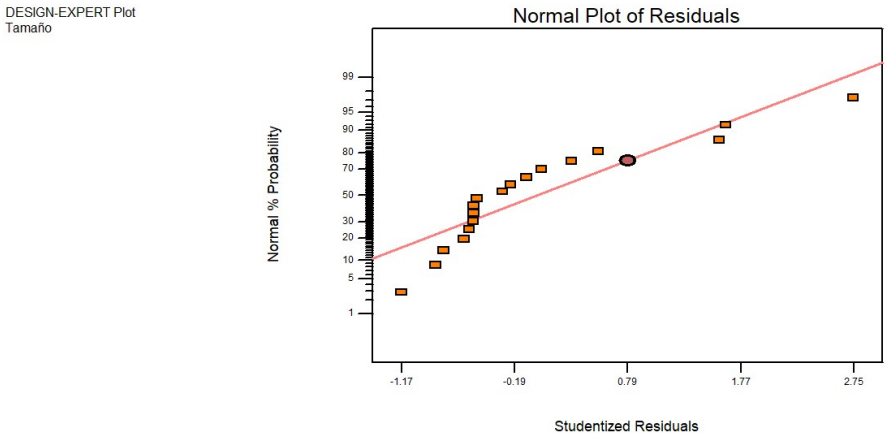
Final Equation in Terms of Actual Factors:

Tamaño =
+220.54500

Diagnostics Case Statistics

Run Order	Standard Order	Actual Value	Predicted Value	Residual	Leverage	Student Residual	Cook's Distance	Outlier t
1	7	232.90	220.55	12.35	0.056	0.536	0.017	0.524
2	2	258.40	220.55	37.85	0.056	1.642	0.159	1.736
3	3	283.90	220.55	63.35	0.056	2.748	0.444	3.575 *
4	17	207.91	220.55	-12.64	0.056	-0.536	0.018	0.548
5	11	221.49	220.55	0.94	0.056	0.041	0.000	0.040
6	12	207.91	220.55	-12.64	0.056	-0.536	0.018	0.548
7	8	215.30	220.55	-5.25	0.056	-0.221	0.003	0.227
8	5	208.60	220.55	-11.95	0.056	-0.507	0.016	0.518
9	18	201.90	220.55	-18.65	0.056	-0.800	0.038	0.809
10	16	207.90	220.55	-12.65	0.056	-0.537	0.018	0.548
11	13	227.50	220.55	6.95	0.056	0.302	0.005	0.293
12	14	257.10	220.55	36.55	0.056	1.585	0.148	1.666
13	15	193.50	220.55	-27.05	0.056	-1.187	0.081	1.173
14	4	206.00	220.55	-14.55	0.056	-0.619	0.023	0.631
15	9	218.50	220.55	-2.05	0.056	-0.086	0.000	0.089
16	6	213.70	220.55	-6.85	0.056	-0.289	0.005	0.297
17	10	200.30	220.55	-20.25	0.056	-0.872	0.045	0.878

18 207.00 220.55 -13.55 0.056 -0.587 0.020 -0.5761



1.1.6 Valor de pH

	Term	DOF	SumSqr	MeanSqr	F	Value
Prob>F	%					Contribtn
Require	Intercept					
Error	A	2	0.0201444	0.0100722	<	0.0001
53.3235	41.6542					
Error	B	1	0.00760556	0.00760556	<	0.0001
40.2647	15.7266					
Error	AB	2	0.0183444	0.00917222	<	0.0001
48.5588	37.9322					
Error	Lack					Of
Fit	0	0				0
Error	Pure					
Error	12	0.00226667				
4.68696						
	Residuals	12	0.00226667	0.000188889		

Use your mouse to right click on individual cells for definitions.

Response: pH

ANOVA for Selected Factorial Model

Analysis of variance table [Partial sum of squares]

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F

Model	0.000	0			
Residual	0.048	17	2.845E-003		
Lack of Fit	*0.046*	*5*	*9.219E-003*		
48.81	*< 0.0001*	*significant*			
Pure Error	*2.267E-003*	*12*	*1.889E-004*		
Cor Total	0.048	17			

Final Equation in Terms of Coded Factors:

pH =
+7.20

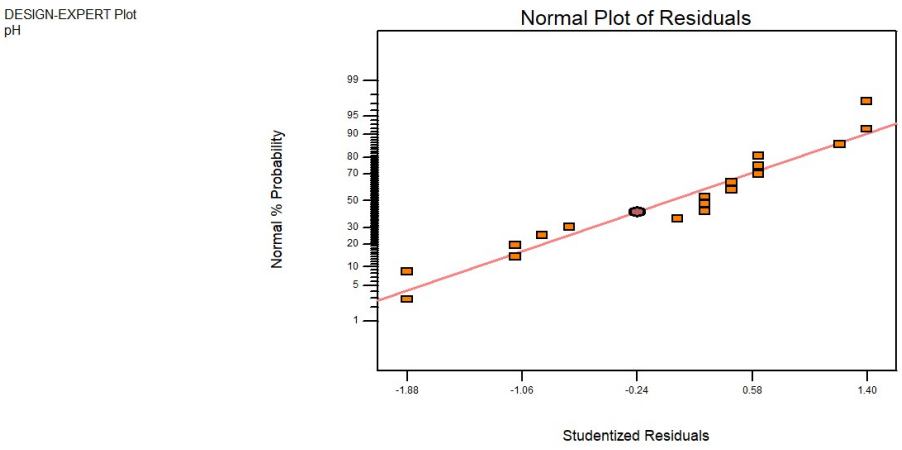
Final Equation in Terms of Actual Factors:

pH =
+7.19722

Diagnostics Case Statistics

Run Order	Standard Order	Actual Value	Predicted Value	Residual	Leverage	Student Residual	Cook's Distance	Outlier t
1	7	7.21	7.20	0.013	0.056	0.247	0.004	0.240
2	2	7.21	7.20	0.013	0.056	0.247	0.004	0.240
3	3	7.23	7.20	0.033	0.056	0.632	0.024	0.621
4	17	7.22	7.20	0.023	0.056	0.439	0.011	0.429
5	11	7.20	7.20	2.778E-003	0.056	0.052	0.000	0.054
6	12	7.23	7.20	0.033	0.056	0.632	0.024	0.621
7	8	7.22	7.20	0.023	0.056	0.439	0.011	0.429
8	5	7.21	7.20	0.013	0.056	0.247	0.004	0.240

	9	7.23	7.20	0.033	0.056	0.632	0.024
	0.621	18					
	10	7.10	7.20	-0.097	0.056	-	
1.876	0.207	-2.043	16				
	11	7.10	7.20	-0.097	0.056	-	
1.876	0.207	-2.043	13				
	12	7.14	7.20	-0.057	0.056	-	
1.104	0.072	-1.112	14				
	13	7.14	7.20	-0.057	0.056	-	
1.104	0.072	-1.112	15				
	14	7.16	7.20	-0.037	0.056	-	
0.718	0.030	-0.707	4				
	15	7.15	7.20	-0.047	0.056	-	
0.911	0.049	-0.906	9				
	16	7.26	7.20	0.063	0.056	1.211	0.086
	1.229	6					
	17	7.27	7.20	0.073	0.056	1.404	0.116
	1.449	10					
	18	7.27	7.20	0.073	0.056	1.404	0.116
	1.449	1					



1.2 Análisis estadístico tratamiento con ultrasonido

1.2.1 Rendimiento

Sequential Model Sum of Squares

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F	
Mean	1229.00	1	1229.00			
Linear	7.92	2	3.96	13.85	0.0013	Suggested
2FI	0.75	1	0.75	3.19	0.1079	
Quadratic	0.73	2	0.37	1.85	0.2260	
Cubic	1.31	2	0.65	44.64	0.0006	Aliased
Residual	0.073	5	0.015			
Total	1239.78	13	95.37			

Lack of Fit Tests

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F	
Linear	2.79	6	0.46	25.44	0.0038	Suggested
2FI	2.04	5	0.41	22.33	0.0051	
Quadratic	1.31	3	0.44	23.88	0.0052	
Cubic	2.000E-004	1	2.000E-			

Model Summary Statistics

Source	Std. Dev.	R-Squared	Adjusted R-Squared	Predicted R-Squared	PRESS	
Linear	0.53	0.7347	0.6817	0.4631	5.79	Suggested
2FI	0.48	0.8041	0.7388	0.3663	6.84	
Quadratic	0.44	0.8719	0.7804	0.1266	9.42	
Cubic	0.12	0.9932	0.9837	0.9882	0.13	Aliased

Response: Ye

ANOVA for Response Surface Quadratic Model

Analysis of variance table [Partial sum of squares]

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F	
Model	9.40	5	1.88	9.53	0.0050	significant
A	*6.50*	*1*	*6.50*	*32.94*	*0.0007*	
B	*1.42*	*1*	*1.42*	*7.21*	*0.0313*	
A^2	*0.28*	*1*	*0.28*	*1.42*	*0.2716*	
B^2	*0.54*	*1*	*0.54*	*2.73*	*0.1422*	
AB	*0.75*	*1*	*0.75*	*3.79*	*0.0926*	
Residual	1.38	7	0.20			
Pure Error	*0.073*	*4*	*0.018*			
Cor Total	10.79	12				

Std. Dev.	0.44	R-Squared	0.8719
Mean	9.72	Adj R-Squared	0.7804
C.V.	4.57	Pred R-Squared	0.1266
PRESS	9.42	Adeq Precision	10.298

	Coefficient Factor	Estimate	Standard DF	Error	95% CI Low	95% CI High	VIF
Intercept	9.43	1	0.20	8.96	9.90		
A-Potencia	0.90	1	0.16	0.53	1.27		1.00
B-Tiempo	0.42	1	0.16	0.050	0.79		1.00
A^2	0.20	1	0.17	-0.20	0.60		1.02
B^2	0.28	1	0.17	-0.12	0.68		1.02
AB	0.43	1	0.22	-0.093	0.96		1.00

Final Equation in Terms of Coded Factors:

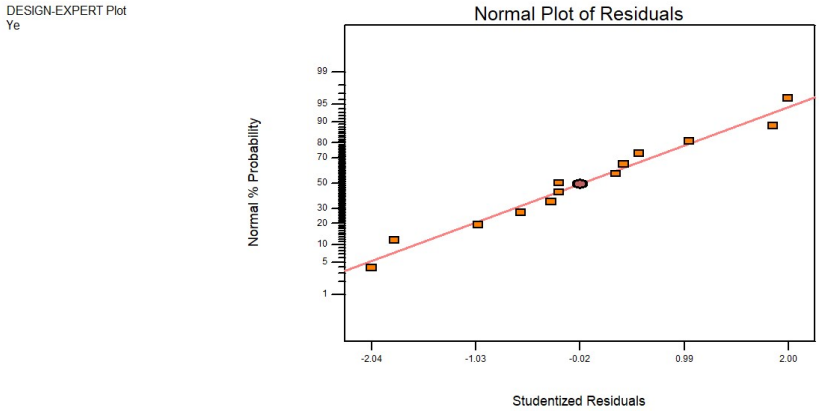
$$Ye = +9.43 +0.90 * A +0.42 * B +0.20 * A^2 +0.28 * B^2 +0.43 * A * B$$

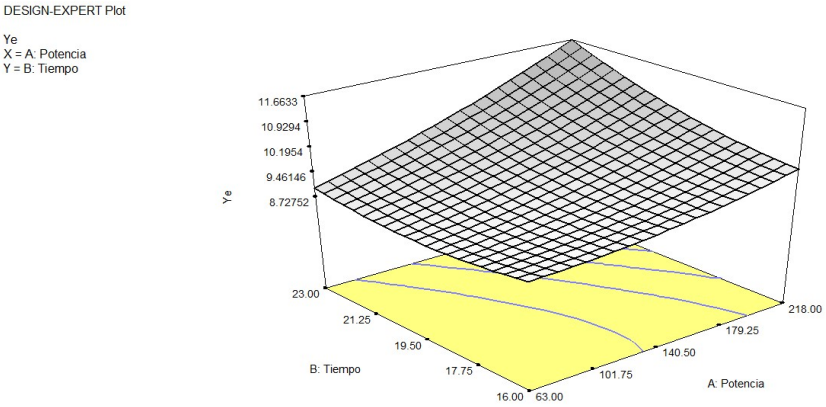
Final Equation in Terms of Actual Factors:

Ye = +19.11752 -0.028864 * Potencia -0.99016 * Tiempo +3.34651E-005 * Potencia^2 +0.022735 * Tiempo^2 +1.59447E-003 * Potencia * Tiempo

Diagnostics Case Statistics

Run Order	Standard Order	Actual Value	Predicted Value	Residual	Leverage	Student Residual	Cook's Distance	Outlier t
1	11	9.30	9.02	0.28	0.625	1.041	0.301	1.049
2	9	9.46	9.95	-0.49	0.625	-1.818	0.918	-2.317
3	3	9.50	9.00	0.50	0.625	1.855	0.956	2.408
4	8	11.39	11.66	-0.27	0.625	-1.005	0.280	-1.005
5	12	8.00	8.56	-0.56	0.625	-2.040	1.156	-2.967
6	4	11.65	11.10	0.55	0.625	2.004	1.115	2.840
7	10	9.54	9.39	0.15	0.625	0.557	0.086	0.527
8	2	10.42	10.58	-0.16	0.625	-0.594	0.098	-0.564
9	5	9.34	9.43	-0.088	0.200	-0.221	0.002	-0.206
10	1	9.31	9.43	-0.12	0.200	-0.297	0.004	-0.277
11	6	9.59	9.43	0.16	0.200	0.408	0.007	0.382
12	13	9.34	9.43	-0.088	0.200	-0.221	0.002	-0.206
13	7	9.56	9.43	0.13	0.200	0.332	0.005	0.310





1.2.2 Humedad

Response: Humedad

Mean	37411.75	1	37411.75		
Suggested					
Linear	72.17	2	36.09	4.68	
0.0368Suggested					
2FI	0.14	1	0.14	0.017	0.8995
Quadratic	26.47	2	13.23	1.83	0.2289
Cubic	28.37	2	14.19	3.20	0.1272 Alias
ed					
Residual	22.15	5	4.43		
Total	37561.06	13	2889.31		

Lack of Fit Tests

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F
Linear	73.56	6	12.26	13.73	0.0121Sugg
ested					
2FI	73.41	5	14.68	16.44	0.0090

Quadratic	46.95	3	15.65	17.53	0.0091
Cubic	18.57	1	18.57	20.80	0.0103 Alias
ed					
Pure Error	3.57	4	0.89		

Model Summary Statistics

Source	Std. Dev.	R-Squared	Adjusted R-Squared	Predicted R-Squared	PRESS
Linear	2.78	0.4834	0.3801	-0.0375	154.91
Suggested					
2FI	2.92	0.4844	0.3125	-0.3875	207.16
Quadratic	2.69	0.6616	0.4199	-1.2734	339.42
Cubic	2.10	0.8517	0.6440	-6.9996	1194.35
Aliased					

Response: Humedad

ANOVA for Response Surface Linear Model
Analysis of variance table [Partial sum of squares]

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F	
Model	72.17	2	36.09	4.68	0.0368	significant
A	*69.15*	*1*	*69.15*	*8.97*	*0.0135*	
B	*3.03*	*1*	*3.03*	*0.39*	*0.5451*	
Residual	77.13	10	7.71			
Lack of Fit	*73.56*	*6*	*12.26*	*13.73*	*0.0121*	*significant*
Pure Error	*3.57*	*4*	*0.89*			
Cor Total	149.30	12				

Std. Dev.	2.78	R-Squared	0.4834
Mean	53.65	Adj R-Squared	0.3801
C.V.	5.18	Pred R-Squared	-0.0375
PRESS	154.91	Adeq Precision	6.233

Factor	Coefficient Estimate	DF	Standard Error	95% CI Low	95% CI High	VIF
Intercept	53.65	1	0.77	51.93	55.36	
A-Potencia	2.94	1	0.98	0.75	5.13	1.00
B-Tiempo	0.61	1	0.98	-1.57	2.80	1.00

Final Equation in Terms of Coded Factors:

Humedad = +53.65 +2.94 * A +0.61 * B

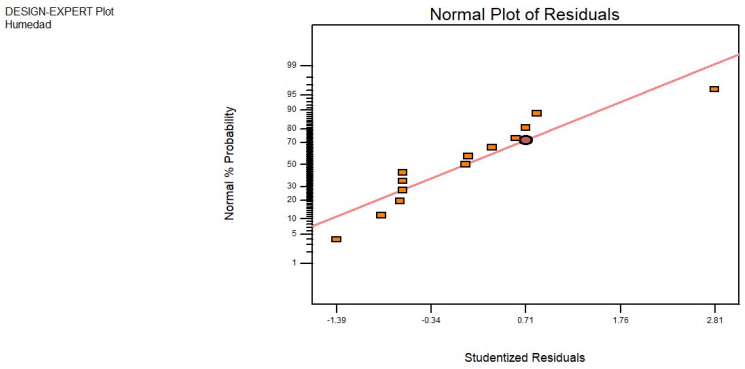
Final Equation in Terms of Actual Factors:

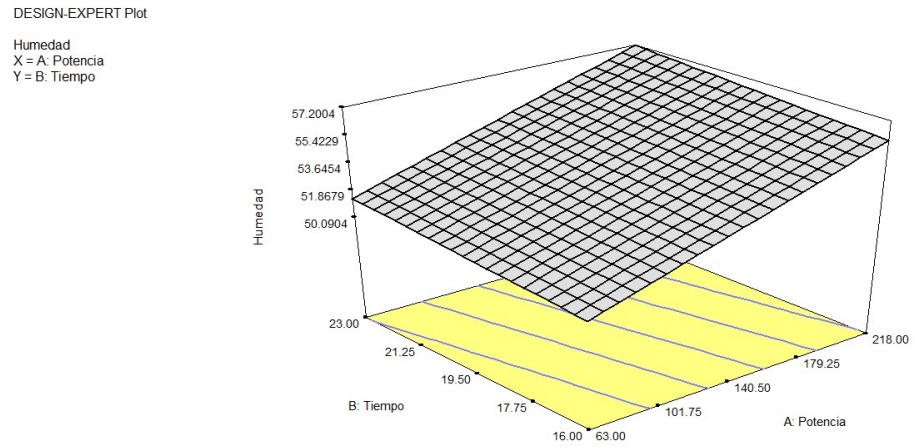
Humedad = +44.88908 +0.037935 * Potencia +0.17571 * Tiempo

Diagnostics Case Statistics

Run Order	Standard Order	Actual Value	Predicted Value	Residual	Leverage	Student Residual	Cook's Distance	Outlier t
1	13	50.86	50.09	0.77	0.327	0.338	0.018	0.322
2	5	52.80	55.97	-3.17	0.327	-1.391	0.313	-1.470
3	9	52.94	51.32	1.62	0.327	0.711	0.082	0.692
4	12	55.64	57.20	-1.56	0.327	-0.685	0.076	-0.665
5	10	50.86	49.49	1.37	0.327	0.602	0.059	0.582
6	7	64.21	57.80	6.41	0.327	2.812	1.280	5.831 *
7	1	54.68	52.78	1.90	0.327	0.836	0.113	0.822
8	11	54.68	54.52	0.16	0.327	0.072	0.001	0.069
9	3	51.90	53.65	-1.75	0.077	-0.654	0.012	-0.634
10	4	51.90	53.65	-1.75	0.077	-0.654	0.012	-0.634
11	2	51.26	53.65	-2.39	0.077	-0.894	0.022	-0.884
12	6	53.76	53.65	0.11	0.077	0.043	0.000	0.041
13	8	51.90	53.65	-1.75	0.077	-0.654	0.012	-0.634

* Case(s) with |Outlier T| > 3.50





1.2.3 Análisis estadístico textura

1.2.3.1 Dureza

Response: Dureza
***** WARNING: The Cubic Model is Aliased! *****

Sequential Model Sum of Squares

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F	
Mean	658.73	1	658.73			
Linear	20.26	2	10.13	8.41	0.0072	Suggested
2FI	1.54	1	1.54	1.32	0.2809	
Quadratic	5.59	2	2.80	3.98	0.0700	Suggested
Cubic	3.43	2	1.72	5.77	0.0502	Aliased
Residual	1.49	5	0.30			
Total	691.05	13	53.16			

Lack of Fit Tests

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F	
Linear	10.57	6	1.76	4.75	0.0767	Sugg

ested						
2FI	9.03	5	1.81	4.87	0.0751	
Quadratic	3.44	3	1.15	3.09	0.1523	Sugg
ested						
Cubic	2.655E-003	1	2.655E-003	7.160E-003	0.9366	Aliased
Pure Error	1.48	4	0.37			

Model Summary Statistics

Source	Std. Dev.	R-Squared	Adjusted R-Squared	Predicted R-Squared	PRESS	
	Linear	1.10	0.6271	0.5525	0.2281	
24.94	Suggested					
2FI	1.08	0.6746	0.5662	0.1481	27.53	
Quadratic	0.84	0.8478	0.7391	0.1723	26.75	Sugg
ested						
Cubic	0.55	0.9540	0.8896	0.9230	2.49	Alias
ed						

Coefficient Factor	Estimate	Standard DF	95% CI Error	95% CI Low	High
Intercept	7.19	1	0.46	6.18	8.21

Final Equation in Terms of Coded Factors:

Dureza = +7.19

Final Equation in Terms of Actual Factors:

Dureza = +7.19335

Standard Order	Actual Value	Predicted Value	Run Order	Residual	Leverage	Student Residual	Cook's Outlier t Distance
1	6.71	7.19	13	-0.49	0.077	-0.291	0.008
2	6.72	7.19	5	-0.47	0.077	-0.283	0.007
3	8.19	7.19	9	0.99	0.077	0.617	0.032
4	7.62	7.19	12	0.43	0.077	0.267	0.006
5	3.09	7.19	10	-4.11	0.077	-2.551	0.542 *
6	7.62	7.19	7	0.43	0.077	0.267	0.006
7	4.38	7.19		-2.82	0.077	-	

1.749	0.255	-1.941	1				
	8	8.39	7.19	1.20	0.077	0.743	0.046
	0.728	11					
	9	8.03	7.19	0.83	0.077	0.518	0.022
	0.502	3					
	10	7.38	7.19	0.18	0.077	0.114	0.001
	0.109	4					
	11	8.67	7.19	1.48	0.077	0.917	0.070
	0.910	2					
	12	8.35	7.19	1.16	0.077	0.719	0.043
	0.704	6					
	13	8.38	7.19	1.18	0.077	0.735	0.045
	0.720	8					

* Case(s) with |Outlier T| > 3.50

Response: Dureza

ANOVA for Response Surface Quadratic Model

Analysis of variance table [Partial sum of squares]

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F
Model	27.40	5	5.48	7.80	0.0088 significant
A	*17.73*	*1*	*17.73*	*25.22*	*0.0015*
B	*2.54*	*1*	*2.54*	*3.61*	*0.0991*
A^2	*3.48*	*1*	*3.48*	*4.95*	*0.0615*
B^2	*1.44*	*1*	*1.44*	*2.05*	*0.1953*
AB	*1.54*	*1*	*1.54*	*2.19*	*0.1826*
Pure Error	*1.48*	*4*	*0.37*		
Cor Total	32.31	12			

Std. Dev.	0.84	R-Squared	0.8478
Mean	7.12	Adj R-Squared	0.7391
C.V.	11.78	Pred R-Squared	0.1723
PRESS	26.75		Adeq Precision 9.175

	Coefficient Factor	Estimate	Standard DF	Error	95% CI Low	95% CI High	VIF
Intercept	7.27	1	0.37	6.39	8.16		
A-Potencia	1.49	1	0.30	0.79	2.19		1.00
B-Tiempo	0.56	1	0.30	-0.14	1.26		1.00
A^2	-0.71	1	0.32	-1.46	0.045		1.02
B^2	0.46	1	0.32	-0.30	1.21		1.02
AB	-0.62	1	0.42	-			

1.61 0.37 1.00

Final Equation in Terms of Coded Factors:

Dureza =
+7.27
+1.49 * A
+0.56 * B
-0.71 * A^2
+0.46 * B^2
-0.62 * A * B

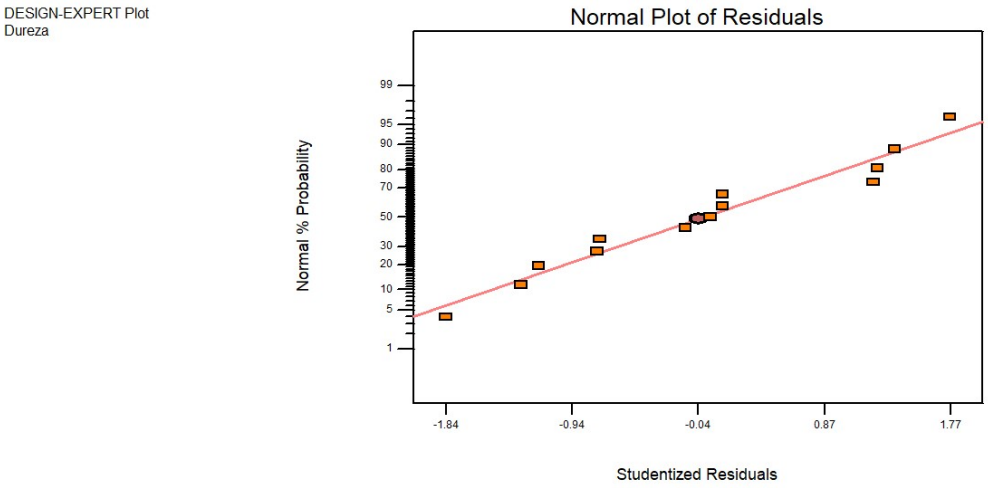
Final Equation in Terms of Actual Factors:

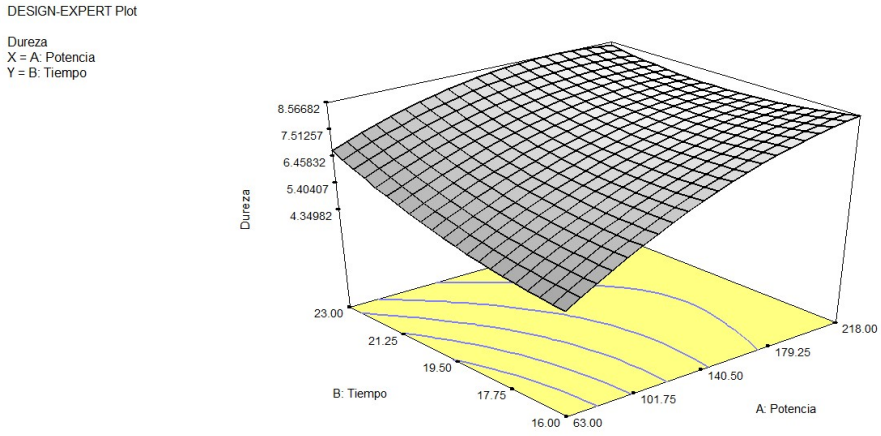
Dureza =
+6.97565
+0.096847 * Potencia
-0.96657 * Tiempo
-1.17683E-004 * $Potencia^2$
+0.037144 * $Tiempo^2$
-2.28571E-003 * Potencia * Tiempo

Diagnostics Case Statistics

Run Order	Standard Order	Actual Value	Predicted Value	Residual	Leverage	Student Residual	Cook's Distance	Outlier t
1	13	4.38	4.35	0.027	0.625	0.053	0.001	0.049
2	5	7.62	8.57	-0.94	0.625	-1.838	0.938	-2.366
3	9	7.62	6.72	0.91	0.625	1.767	0.867	2.198
4	12	8.39	8.45	-0.064	0.625	-0.124	0.004	-0.115
5	10	3.09	3.75	-0.67	0.625	-1.302	0.471	-1.384
6	7	8.67	7.96	0.70	0.625	1.373	0.523	1.486
7	1	8.03	7.39	0.64	0.625	1.247	0.432	1.310
8	11	8.38	8.98	-0.60	0.625	-1.177	0.384	-1.216
9	3	6.72	7.27	-0.55	0.200	-0.739	0.023	-0.712
10	4	7.38	7.27	0.10	0.200	0.138	0.001	0.128
11		6.71	7.27	-0.57	0.200			

0.756	0.024	-0.730	2				
	12	8.19	7.27	0.91	0.200	1.218	0.062
	1.270	6					
	13	7.38	7.27	0.10	0.200	0.138	0.001
	0.128	8					





1.2.3.2 Elasticidad

Response: Elasticidad

***** WARNING: The Cubic Model is Aliased! *****

Sequential Model Sum of Squares

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F	
Mean	16.71	1	16.71			
Suggested						
Linear	6.602E-003	2	3.301E-003	0.13	0.8831	
2FI	2.320E-003	1	2.320E-003	0.080	0.7833	
Quadratic	0.12	2	0.060	2.98	0.1160	Suggested

Cubic	0.029	2	0.014	0.65	0.5627	Aliased
Residual	0.11	5	0.022			
Total	16.98	13	1.31			

Lack of Fit Tests

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F	
Linear	0.17	6	0.029	1.27	0.4258	
2FI	0.17	5	0.034	1.51	0.3561	
Quadratic	0.050	3	0.017	0.74	0.5790	Suggested
Cubic	0.021	1	0.021	0.95	0.3841	Aliased
Pure Error	0.090	4	0.023			

"Lack of Fit Tests": Want the selected model to have insignificant lack-of-fit.

Model Summary Statistics

Source	Std. Dev.	R-Squared	Adjusted R-Squared	Predicted R-Squared	PRESS	
Linear	0.16	0.0246	-0.1705	-0.5244	0.41	
2FI	0.17	0.0332	-0.2891	-0.7154	0.46	
Quadratic	0.14	0.4775	0.1043	-0.8554	0.50	Suggested
Cubic	0.15	0.5849	0.0036	-4.6380	1.52	Aliased

Response:Elasticidad

ANOVA for Response Surface Quadratic Model

Analysis of variance table [Partial sum of squares]

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F	
Model	0.13	5	0.026	1.28	0.3692	not significant
A	*1.109E-005*	*1*	*1.109E-005*	*5.525E-004*	*0.9819*	
B	*6.591E-003*	*1*	*6.591E-003*	*0.33*	*0.5845*	
A^2	*0.063*	*1*	*0.063*	*3.13*	*0.1201*	
B^2	*0.072*	*1*	*0.072*	*3.59*	*0.0998*	
AB	*2.320E-003*	*1*	*2.320E-003*	*0.12*	*0.7438*	
Residual	0.14	7	0.020			
Pure Error	*0.090*	*4*	*0.023*			
Cor Total	0.27	12				

Std. Dev.	0.14			R-Squared	0.4775
Mean	1.13		Adj R-Squared	0.1043
C.V.	12.49		Pred R-Squared	-0.8554
PRESS	0.50			Adeq Precision	2.607

	Coefficient Factor VIF	Estimate	Standard DF	95% CI Error	95% CI Low	High
Intercept	1.25	1	0.063	1.11	1.40	
A-Potencia	1.177E-003	1	0.050	-	0.12	0.12
B-Tiempo	-0.029	1	0.050	-	0.15	0.090
A^2	-0.095	1	0.054	-	0.22	0.032
B^2	-0.10	1	0.054	-	0.23	0.025
AB	0.024	1	0.071	-	0.14	0.19

Final Equation in Terms of Coded Factors:

Elasticidad	=
+1.25	
+1.177E-003	* A
-0.029	* B
-0.095	* A^2
-0.10	* B^2
+0.024	* A * B

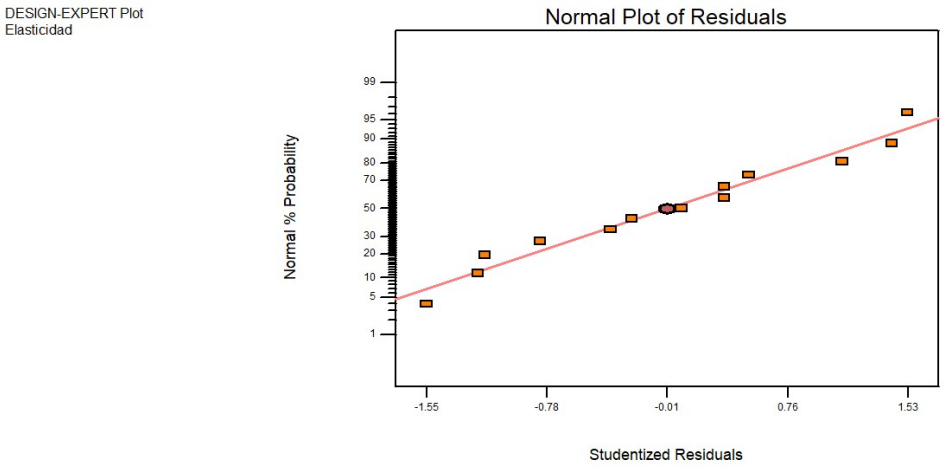
Final Equation in Terms of Actual Factors:

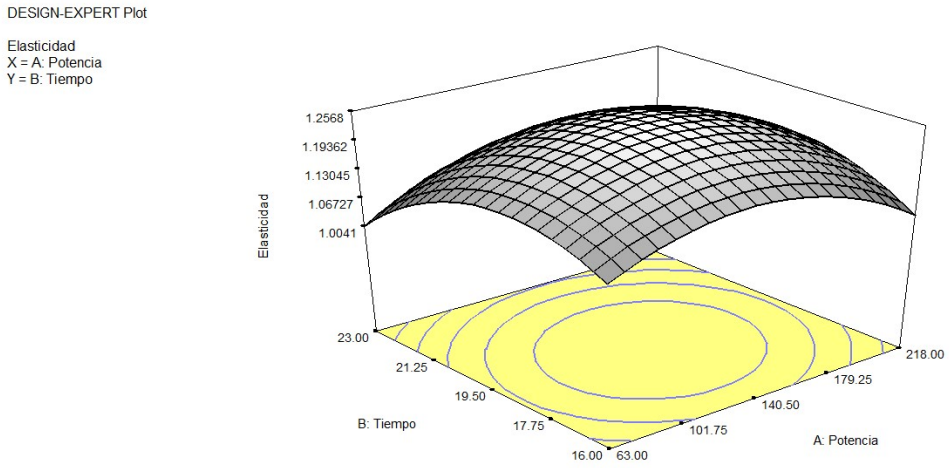
Elasticidad	=
-1.81721	
+2.73103E-003	* Potencia
+0.30351	* Tiempo
-1.58263E-005	* $Potencia^2$
-8.31236E-003	* $Tiempo^2$
+8.87867E-005	* Potencia * Tiempo

Diagnostics Case Statistics

Run Order	Standard Order	Actual Value	Predicted Value	Residual	Leverage	Student Residual	Cook's Distance	Outlier
1	13	1.23	1.11	0.12	0.625	1.430	0.568	1.574
2	5	1.16	1.06	0.096	0.625	1.112	0.344	1.135
3	9	1.01	1.00	7.162E-003	0.625	0.076	0.002	0.083
4		1.03	1.05	-0.020	0.625	-		

0.236	0.015	-0.219	12				
	5	0.99	1.06	-0.071	0.625	-	
0.822	0.188	-0.801	10				
	6	1.03	1.07	-0.032	0.625	-	
0.372	0.039	-0.348	7				
	7	0.96	1.09	-0.13	0.625	-	
1.550	0.668	-1.771	1				
	8	1.04	1.01	0.031	0.625	0.356	0.035
	0.332	11					
	9	1.30	1.25	0.045	0.200	0.356	0.005
	0.332	3					
	10	1.32	1.25	0.065	0.200	0.513	0.011
	0.485	4					
	11	1.45	1.25	0.19	0.200	1.531	0.098
	1.738	2					
	12	1.11	1.25	-0.15	0.200	-	
1.177	0.058	-1.217	6				
	13	1.10	1.25	-0.15	0.200	-	
1.223	0.062	-1.277	8				





1.2.3.3 Cohesividad

Sequential Model Sum of Squares

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F
Mean	3.33	1	3.33		
Suggested					
Linear	1.129E-003	2	5.645E-004	0.33	0.7232
2FI	2.688E-003	1	2.688E-003	1.71	0.2238
Quadratic	3.462E-003	2	1.731E-003	1.13	0.3751
Cubic	1.038E-003	2	5.189E-004	0.27	0.7751
Aliased					
Residual	9.672E-003	5	1.934E-003		
Total	3.34	13	0.26		

Lack of Fit Tests

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F
Linear	8.733E-003	6	1.455E-003	0.72	0.6601
2FI	6.045E-003	5	1.209E-003	0.60	0.7108
Quadratic	2.583E-003	3	8.609E-004	0.42	0.7468
Cubic	1.545E-003	1	1.545E-003	0.76	0.4324
Aliased					
Pure Error	8.127E-003	4	2.032E-003		

Model Summary Statistics

Source	Std. Dev.	R-Squared	Adjusted R-Squared	Predicted R-Squared	PRESS
Linear	0.041	0.0628	-0.1247	0.47940.027	
2FI	0.040	0.2122	-0.0504	-0.7867	0.032
Quadratic	0.039	0.4047	-0.0206	-0.7269	0.031
Cubic	0.044	0.4623	-0.2904	-5.20250.11	Aliased

Response: Cohesividad

ANOVA for Response Surface Mean Model Analysis of variance table [Partial sum of squares]

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F
Model	0.000	0			
Residual	0.018	12	1.499E-003		

Std. Dev.	0.039	R-Squared	0.0000
Mean	0.51	Adj R-Squared	0.0000
C.V.	7.65	Pred R-Squared	-0.1736
PRESS	0.021	Adeq Precision	

Coefficient Factor	Estimate	Standard DF	95% CI Error	95% CI Low	High
Intercept	0.51	1	0.011	0.48	0.53

Final Equation in Terms of Coded Factors:

Cohesividad = +0.51

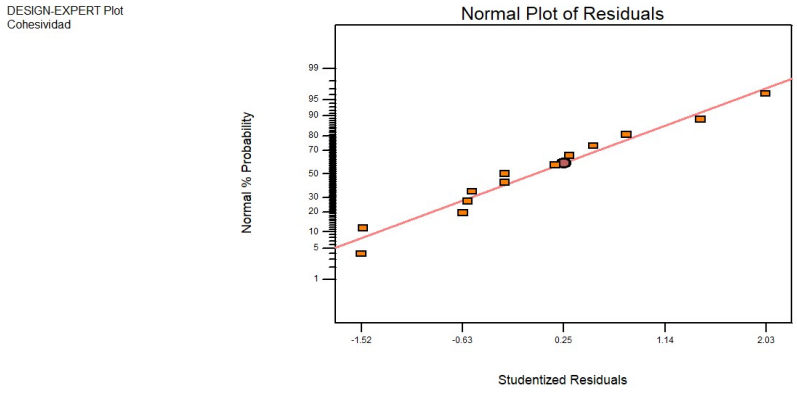
Final Equation in Terms of Actual Factors:

Cohesividad = +0.50581

Diagnostics Case Statistics

Run Order	Standard Order	Actual Value	Predicted Value	Residual	Leverage	Student Residual	Cook's Distance	Outlier
1	13	0.52	0.51	0.011	0.077	0.306	0.008	0.294
2	5	0.54	0.51	0.030	0.077	0.807	0.054	0.795
3	9	0.58	0.51	0.075	0.077	2.027	0.342	2.394
4	12	0.50	0.51	-9.630E-003	0.077	-0.259	0.006	-0.249
5	10	0.51	0.51	6.820E-003	0.077	0.183	0.003	0.176
6	7	0.50	0.51	-9.630E-003	0.077	-0.259	0.006	-0.249
7	1	0.52	0.51	0.019	0.077	0.515	0.022	0.499
8	11	0.49	0.51	-0.020	0.077	-0.547	0.025	-0.530
9	3	0.48	0.51	-0.022	0.077	-0.587	0.029	-0.570

	10	0.45	0.51	-0.056	0.077	-	
1.500	0.188	-1.594	4				
	11	0.45	0.51	-0.056	0.077	-	
1.517	0.192	-1.616	2				
	12	0.48	0.51	-0.023	0.077	-	
0.627	0.033	-0.610	6				
	13	0.56	0.51	0.054	0.077	1.457	0.177
	1.537	8					



1.2.3.4 Masticabilidad

Sequential Model Sum of Squares						
Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F	
Mean	45.90	1	45.90			
Suggested						
Linear	0.27	2	0.14	0.81	0.4732	
2FI	0.074	1	0.074	0.41	0.5355	
Quadratic	0.073	2	0.036	0.17	0.8500	
Cubic	0.52	2	0.26	1.27	0.3575	Aliased
Residual	1.02	5	0.20			
Total	47.85	13	3.68			

Lack of Fit Tests					
Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F
Linear	1.43	6	0.24	3.85	0.1064
2FI	1.36	5	0.27	4.38	0.0886

Quadratic	1.29	3	0.43	6.91	0.0463
Cubic	0.77	1	0.77	12.39	0.0244 Alias ed
Pure Error	0.25	4	0.062		

Model Summary Statistics

Source	Std. Dev.	R-Squared	Adjusted R-Squared	Predicted R-Squared	PRESS	
Linear	0.41	0.1390	-0.0332	-0.7560	3.43	
2FI	0.42	0.1769	-0.0974	-1.6092	5.09	
Quadratic	0.47	0.2143	-0.3470	-3.8824	9.53	
Cubic	0.45	0.4793	-0.2496	-24.3902	49.54	Aliased

Response: Masticabilidad

ANOVA for Response Surface Mean Model
Analysis of variance table [Partial sum of squares]

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F	
Model	0.000	0				
Residual	1.95	12	0.16			
Lack of Fit	*1.70*	*8*	*0.21*	*3.44*	*0.1242*	*not significant*
Pure Error	*0.25*	*4*	*0.062*			
Cor Total	1.95	12				

Std. Dev.	0.40	R-Squared	0.0000
Mean	1.88	Adj R-Squared	0.0000
C.V.	21.46	Pred R-Squared	-0.1736
PRESS	2.29	Adeq Precision	

Factor	Coefficient Estimate	DF	Standard Error	95% CI Low	95% CI High
Intercept	1.88	1	0.11	1.64	2.12

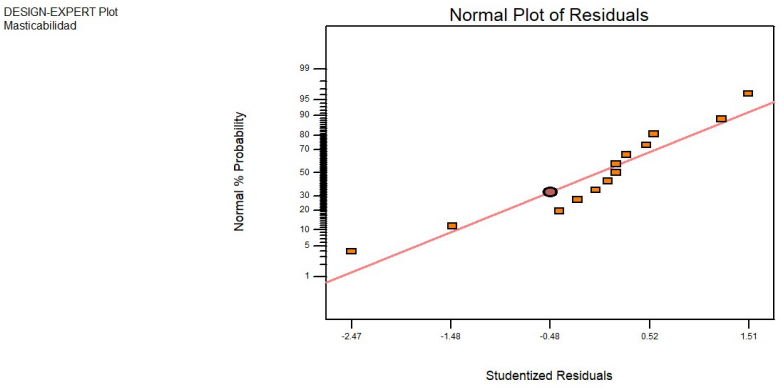
Final Equation in Terms of Coded Factors:

Masticabilidad =
+1.88

Final Equation in Terms of Actual Factors:

Masticabilidad =
+1.87903

Standard Order	Actual Value	Predicted Value	Residual	Run Order	Leverage	Student Residual	Outlier t	Cook's Distance
1	2.07	1.88	0.19	0.077	0.486	0.470	13	0.020
2	2.10	1.88	0.22	0.077	0.562	0.546	5	0.026
3	2.46	1.88	0.59	0.077	1.512	1.609	9	0.190
4	1.95	1.88	0.071	0.077	0.183	0.176	12	0.003
5	0.92	1.88	-0.96	0.077	-	2.475	0.510	-3.386	10	
6	1.95	1.88	0.071	0.077	0.183	0.176	7	0.003
7	1.31	1.88	-0.57	0.077	-	1.464	0.179	-1.547	1	
8	1.92	1.88	0.039	0.077	0.101	0.096	11	0.001
9	1.73	1.88	-0.15	0.077	-	0.389	0.013	-0.375	3	
10	1.87	1.88	-9.026E-003	0.077	-	0.023	0.000	-0.022	4	
11	1.80	1.88	-0.079	0.077	-	0.204	0.003	-0.196	2	
12	2.36	1.88	0.48	0.077	1.242	1.274	6	0.128
13	1.99	1.88	0.11	0.077	0.286	0.275	8	0.007



1.2.3.5 Adhesividad

Source	Sequential Sum of Squares	DF	Model Sum of Squares Mean Square	F Value	Prob > F
Mean	1.22	1	1.22		
Suggested					

Linear	1.129E-003	2	5.645E-004	0.33	0.7232
2FI	2.688E-003	1	2.688E-003	1.71	0.2238
Quadratic	3.462E-003	2	1.731E-003	1.13	0.3751
Cubic	1.038E-003	2	5.189E-004	0.27	0.7751
Aliased					
Residual	9.672E-003	5	1.934E-003		
Total	1.23	13	0.095		

Lack of Fit Tests

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F
Linear	8.733E-003	6	1.455E-003	0.72	0.6601
2FI	6.045E-003	5	1.209E-003	0.60	0.7108
Quadratic	2.583E-003	3	8.609E-004	0.42	0.7468
Cubic	1.545E-003	1	1.545E-003	0.76	0.4324
Aliased					
Pure Error	8.127E-003	4	2.032E-003		

Model Summary Statistics

Source	Std. Dev.	R-Squared	Adjusted R-Squared	Predicted R-Squared	PRESS
Linear	0.047	0.041	0.0628	-0.1247	0.027
2FI	0.040	0.2122	-0.0504	-0.7867	0.032
Quadratic	0.039	0.4047	-0.0206	-0.7269	0.031
Cubic	0.044	0.4623	-0.2904	-5.2025	0.11
Aliased					

Response:Adhesividad

ANOVA for Response Surface Mean Model

Analysis of variance table [Partial sum of squares]

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F
Model	0.000	0			
Residual	0.018	12	1.499E-003		
Lack of Fit	*9.862E-003*	*8*	*1.233E-003*	*0.61*	*0.7464*
not significant					
Pure Error	*8.127E-003*	*4*	*2.032E-003*		
Cor Total	0.018	12			

Std. Dev.	0.039	R-Squared	0.0000
Mean	-0.31	Adj R-Squared	0.0000
C.V.	-12.66	Pred R-Squared	-0.1736
PRESS	0.021	Adeq Precision	

Factor	Coefficient Estimate	DF	Standard Error	95% CI Low

High					
Intercept	-0.31	1	0.011	-	
0.33	-0.28				

Final Equation in Terms of Coded Factors:

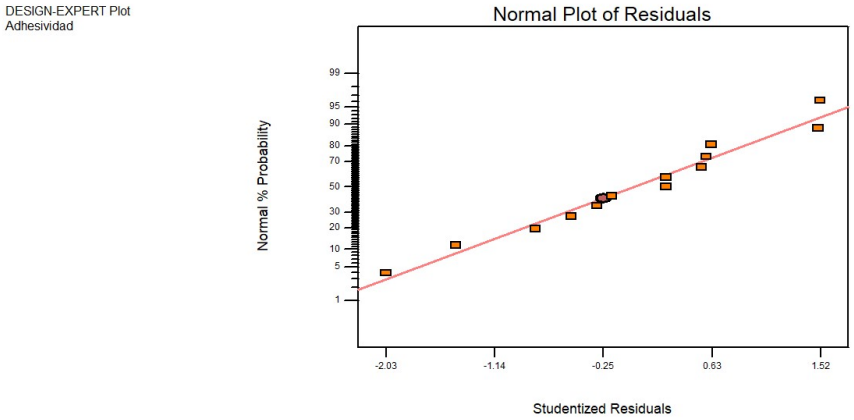
Adhesividad =
-0.31

Final Equation in Terms of Actual Factors:

Adhesividad =
-0.30581

Diagnostics Case Statistics

Run Order	Standard Order	Actual Value	Predicted Value	Residual	Leverage	Student Residual	Cook's Distance	Outlier
1	13	-0.32	-0.31	-0.011	0.077	-0.306	0.008	
2	5	-0.34	-0.31	-0.030	0.077	-0.807	0.054	
3	9	-0.38	-0.31	-0.075	0.077	-2.027	0.342	
4	12	-0.30	-0.31	9.630E-003	0.077	0.249	0.006	
5	10	-0.31	-0.31	-6.820E-003	0.077	-0.183	0.003	
6	7	-0.30	-0.31	9.630E-003	0.077	0.249	0.006	
7	1	-0.32	-0.31	-0.019	0.077	-0.515	0.022	
8	16	-0.29	-0.547	0.025	0.530	0.31	0.020	11
9	3	-0.28	-0.587	0.029	0.570	0.31	0.022	3
10	14	-0.25	-1.500	0.188	1.594	0.31	0.056	4
11	2	-0.25	-1.517	0.192	1.616	0.31	0.056	2
12	15	-0.28	-0.627	0.033	0.610	0.31	0.023	6
13	11	-0.36	-0.31	-0.054	0.077	-1.457	0.177	



1.2.3.6 Gomosidad

Sequential Model Sum of Squares

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F
Mean	0.41	1	0.41		
Suggested					
Linear	3.927E-003	2	1.964E-003	1.76	0.2212
Suggested					
2FI	1.167E-003	1	1.167E-003	1.05	0.3318
Quadratic	1.000E-003	2	5.001E-004	0.39	0.6911
Cubic	3.974E-003	2	1.987E-003	1.98	0.2322
Aliased					
Residual	5.009E-003	5	1.002E-003		
Total	0.43	13	0.033		

Lack of Fit Tests

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F
Linear	0.010	6	1.684E-003	6.44	0.0465
Suggested					
2FI	8.937E-003	5	1.787E-003	6.83	0.0431
Quadratic	7.937E-003	3	2.646E-003	10.11	0.0244
Cubic	3.963E-003	1	3.963E-003	15.14	0.0177
Aliased					
Pure Error	1.047E-003	4	2.617E-004		

Model Summary Statistics

Source	Std. Dev.	R-Squared	Adjusted R-Squared	Predicted R-Squared	PRESS
Linear	0.033	0.2605	0.1126	-	
Suggested					
2FI	0.033	0.3379	0.1171	-1.0649	0.031
Quadratic	0.036	0.4042	-0.0214	-2.8517	0.058
Cubic	0.032	0.6678	0.2026	-	
Aliased					

Response:Gomosidad

ANOVA for Response Surface Linear Model

Analysis of variance table [Partial sum of squares]

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F
Model	3.927E-003	2	1.964E-003	1.76	0.2212 not significant
A	*1.090E-003*	*1*	*1.090E-003*	*0.98*	*0.3461*
B	*2.837E-003*	*1*	*2.837E-003*	*2.54*	*0.1418*
Residual	0.011	10	1.115E-003		
Lack of Fit	*0.010*	*6*	*1.684E-003*	*6.44*	*0.0465 significant*
Pure Error	*1.047E-003*	*4*	*2.617E-004*		
Cor Total	0.015	12			

Std. Dev.	0.033	R-Squared	0.2605
Mean	0.18	Adj R-Squared	0.1126
C.V.	18.73	Pred R-Squared	-0.5352
PRESS	0.023	Adeq Precision	3.8

Factor	Coefficient Estimate	DF	Standard Error	95% CI Low	95% CI High	VIF
Intercept	0.18	1	9.261E-003	0.16	0.20	
A-Potencia	0.012	1	0.012	-0.015	0.038	1.00
B-Tiempo	0.019	1	0.012	-7.474E-003	0.045	1.00

Final Equation in Terms of Coded Factors:

Gomosidad =
+0.18
+0.012 * A
+0.019 * B

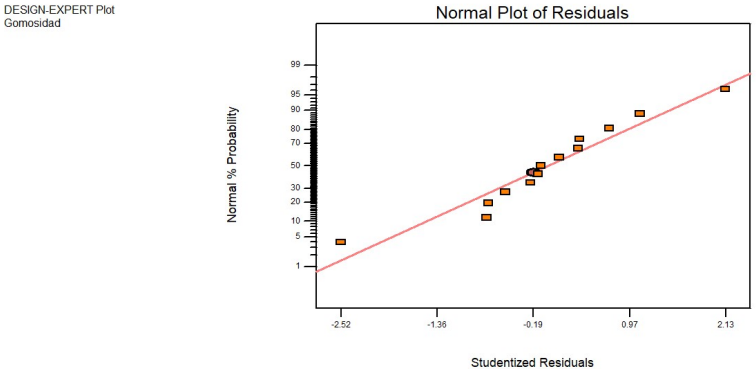
Final Equation in Terms of Actual Factors:

Gomosidad =
+0.052190
+1.50637E-004 * Potencia
+5.38028E-003 * Tiempo

Order	Actual Value	Predicted Value	Residual	Leverage	Student Residual	Cook's Distance	Outlier t	Run Order
1	0.17	0.15	0.020	0.327	0.723	0.085	0.705	13
2	0.18	0.17	9.600E-003	0.334	0.327	0.350	0.020	5
3	0.24	0.19	0.058	0.327	2.128	0.733	2.729	9

	4	0.19	0.21	-0.020	0.327	-	
0.738	0.088	-0.720	12				
	5	0.093	0.16	-0.069	0.327	-	
2.518	1.026	-3.947 *	10				
	6	0.19	0.19	-6.230E-003	0.327	-	
0.227	0.008	-0.216	7				
	7	0.14	0.15	-0.015	0.327	-	
0.534	0.046	-0.514	1				
	8	0.18	0.20	-0.021	0.327	-	
0.757	0.093	-0.740	11				
	9	0.18	0.18	3.833E-			
003	0.077	0.119	0.000	0.113	3		
	10	0.17	0.18	-3.270E-003	0.077	-	
0.102	0.000	-0.097	4				
	11	0.17	0.18	-4.364E-003	0.077	-	
0.136	0.001	-0.129	2				
	12	0.21	0.18	0.035	0.077	1.096	0.033
	1.108	6					
	13	0.19	0.18	0.012	0.077	0.366	0.004
	0.349	8					

* Case(s) with |Outlier T| > 3.50



1.2.4 Tamaño de particula

Sequential Model Sum of Squares						
Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F	
Mean	7.526E+005	1	7.526E+005			
Linear	472.71	2	236.36	4.37	0.0432	
2FI	176.00	1	176.00	4.34	0.0668	
Quadratic	245.59	2	122.79	7.22	0.0199	Suggested
Cubic	49.15	2	24.58	1.76	0.2640	Aliased
Residual	69.86	5	13.97			
Total	7.536E+005	13	57969.01			

Lack of Fit Tests					
Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F

Linear	539.38	6	89.90	294.82	<	0.0001
2FI	363.38	5	72.68	238.34	<	0.0001
Quadratic	117.79	3	39.26	128.77	0.0002	Suggested
Cubic	68.64	1	68.64	225.10	0.0001	Aliased
Pure Error	1.22	4	0.30			

Model Summary Statistics

Source	Std. Dev.	R-Squared	Adjusted R-Squared	Predicted R-Squared	PRESS	
Linear	7.35	0.4665	0.3598	-0.1409	1156.06	
2FI	6.36	0.6402	0.5203	-0.1190	1133.88	
Quadratic	4.12	0.8826	0.7987	0.1715	839.52	Suggested
Cubic	3.74	0.9311	0.8345	-3.3370	4394.71	Aliased

Response: Tamaño de particula

ANOVA for Response Surface Quadratic Model

Analysis of variance table [Partial sum of squares]

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F	
Model	894.30	5	178.86	10.52	0.0037	significant
A	*178.45*	*1*	*178.45*	*10.50*	*0.0143*	
B	*294.26*	*1*	*294.26*	*17.31*	*0.0042*	
A^2	*216.64*	*1*	*216.64*	*12.74*	*0.0091*	
B^2	*11.66*	*1*	*11.66*	*0.69*	*0.4350*	
AB	*176.00*	*1*	*176.00*	*10.35*	*0.0147*	
Residual	119.01	7	17.00			
Std. Dev.	4.12		R-Squared	0.8826		
Mean	240.61		Adj R-Squared	0.7987		
C.V.	1.71		Pred R-Squared	0.1715		
PRESS	839.52				Adeq Precision	11.058

Coefficient	Factor	Estimate	DF	Standard Error	95% CI Low	95% CI High	VIF
Intercept		237.97	1	1.84	233.61	242.33	
A-Potencia		-4.72	1	1.46	-8.17	-1.28	1.00
B-Tiempo		-6.06	1	1.46	-9.51	-2.62	1.00
A^2		5.58	1	1.56	1.88	9.28	1.02
B^2		-1.29	1	1.56	-4.99	2.40	1.02
AB		-6.63	1	2.06	-11.51	-1.76	1.00

Final Equation in Terms of Coded Factors:

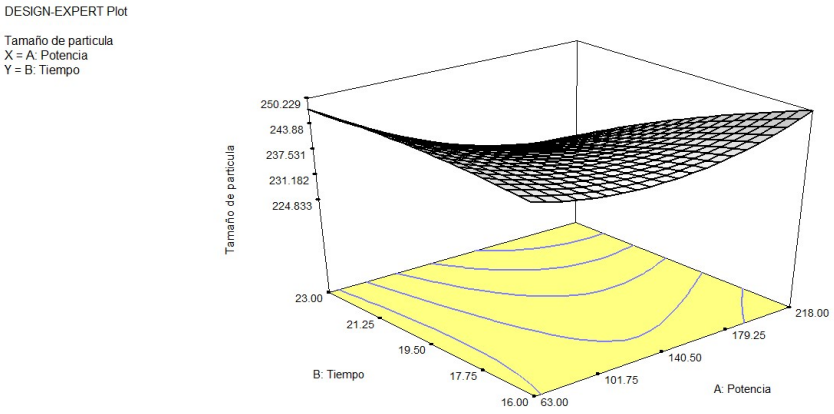
Tamaño de particula =
+237.97
-4.72 * A
-6.06 * B
+5.58 * A^2
-1.29 * B^2
-6.63 * A * B

Final Equation in Terms of Actual Factors:

Tamaño de particula =
+191.48211
+0.15483 * Potencia
+5.82410 * Tiempo
+9.29125E-004 * $Potencia^2$
-0.10567 * $Tiempo^2$
-0.024454 * Potencia * Tiempo

Standard Order	Actual Value	Predicted Value	Residual	Leverage	Student Residual	Outlier t	Run Order	Cook's Distance
1	252.10	246.41	5.69	0.625	2.254	1.411	13	3.985 *
2	251.00	250.23	0.77	0.625	0.305	0.026	5	0.285
3	252.63	247.55	5.09	0.625	2.015	1.128	9	2.878
4	225.00	224.83	0.17	0.625	0.066	0.001	12	0.061
5	249.40	255.81	-6.41	0.625	-2.538	-1.789	10	-8.319 *
6	243.00	242.45	0.55	0.625	0.218	0.013	7	0.202
7	240.60	243.96	-3.36	0.625	-1.329	-0.491	1	-1.423
8	224.30	226.80	-2.50	0.625	-0.991	-0.273	11	-0.989
9	237.44	237.97	-0.53	0.200	-0.143	-0.001	3	-0.133
10	238.10	237.97	0.13	0.200	0.036	0.000	4	0.033
11	238.76	237.97	0.79	0.200	0.215	0.002	2	0.199
12	237.44	237.97	-0.53	0.200	-0.143	-0.001	6	-0.133
13	238.10	237.97	0.13	0.200	0.036	0.000	8	0.033

* Case(s) with |Outlier T| > 3.50



1.2.5 Hidrofobicidad-Leche

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F	
Mean	3.504E+005	1	3.504E+005			
Linear	13183.86	2	6591.93	5.48	0.0247	
2FI	1925.94	1	1925.94	1.72	0.2227	
Quadratic	6943.93	2	3471.96	7.70	0.0171	Suggested
Cubic	1691.19	2	845.60	2.88	0.1470	Aliased
Residual	1466.46	5	293.29			
Total	3.756E+005	13	28892.93			

Lack of Fit Tests

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F	
Linear	12026.30	6	2004.38	6573.47	< 0.0001	
2FI	10100.36	5	2020.07	6624.93	< 0.0001	
Quadratic	3156.43	3	1052.14	3450.56	< 0.0001	Suggested
Cubic	1465.24	1	1465.24	4805.33	< 0.0001	Aliased
Pure Error	1.22	4	0.30			

Model Summary Statistics

Source	Std. Dev.	R-Squared	Adjusted R-Squared	Predicted R-Squared	PRESS	
Linear	34.68	0.5229	0.4275	-0.0411	26248.58	
2FI	33.50	0.5993	0.4658	-0.0272	25896.86	
Quadratic	21.24	0.8748	0.7853	0.1096	22447.66	Suggested
Cubic	17.13	0.9418	0.8604	-2.7196	93777.41	Aliased

Response:Hidrofobicidad-Leche

ANOVA for Response Surface Quadratic Model

Analysis of variance table [Partial sum of squares]

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F
Model	22053.73	5	4410.75	9.78	0.0046 significant
A	*3033.04*	*1*	*3033.04*	*6.72*	*0.0358*
B	*10150.82*	*1*	*10150.82*	*22.50*	*0.0021*
A^2	*4810.11*	*1*	*4810.11*	*10.66*	*0.0138*
B^2	*1350.73*	*1*	*1350.73*	*2.99*	*0.1272*
AB	*1925.94*	*1*	*1925.94*	*4.27*	*0.0776*
Residual	3157.65	7	451.09		
Lack of Fit	*3156.43*	*3*	*1052.14*	*3450.56*	*< 0.0001significant*
Pure Error	*1.22*	*4*	*0.30*		
Cor Total	25211.38	12			

Std. Dev.	21.24	R-Squared	0.8748
Mean	164.18	Adj R-Squared	0.7853
C.V.	12.94	Pred R-Squared	0.1096
PRESS	22447.66	Adeq Precision	10.976

.

Coefficient	Factor	Estimate	Standard DF	Error	95% CI Low	95% CI High	VIF
Intercept		171.78	1	9.50	149.32	194.24	
A-Potencia		19.47	1	7.51	1.72	37.23	1.00
B-Tiempo		35.62	1	7.51	17.86	53.38	1.00
A^2		-26.30	1	8.05	-45.34	-7.25	1.02
B^2		13.93	1	8.05	-5.11	32.98	1.02
AB		21.94	1	10.62	-3.17	47.05	1.00

Final Equation in Terms of Coded Factors:

Hidrofobicidad-Leche =

+171.78

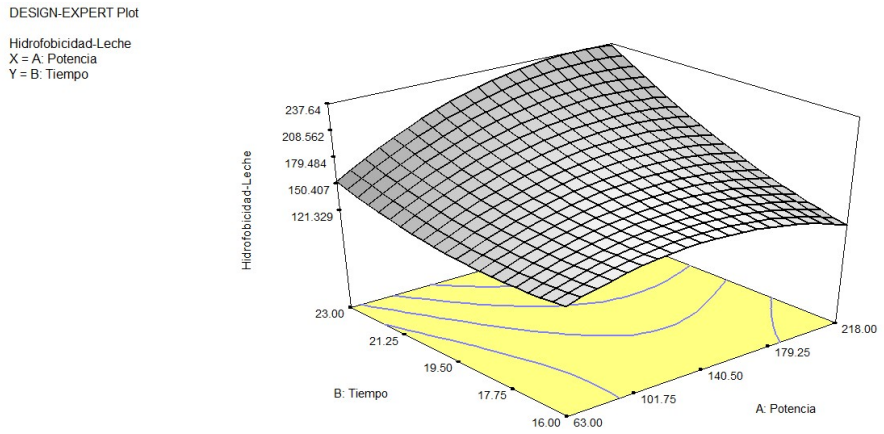
+19.47	* A
+35.62	* B
-26.30	* A^2
+13.93	* B^2
+21.94	* A * B

Final Equation in Terms of Actual Factors:

Hidrofobicidad-Leche	=
+505.76758	
-0.095986	* Potencia
-45.55095	* Tiempo
-4.37802E-003	* $Potencia^2$
+1.13750	* $Tiempo^2$
+0.080895	* Potencia * Tiempo

Standard Order	Actual Value	Predicted Value	Residual	Leverage	Student Residual	Cook's Distance	Outlier t	Run Order
1	147.60	126.27	21.33	0.625	1.640	0.747	1.935	13
2	153.89	121.33	32.56	0.625	2.503	1.741	7.163 *	5
3	148.14	153.63	-5.49	0.625	-0.422	0.050	-0.396	9
4	242.19	236.46	5.74	0.625	0.441	0.054	0.414	12
5	86.06	91.65	-5.59	0.625	-0.430	0.051	-0.404	10
6	125.25	146.73	-21.47	0.625	-1.651	0.757	-1.956	7
7	116.78	149.28	-32.50	0.625	-2.499	1.735	-7.041 *	1
8	255.46	250.03	5.43	0.625	0.418	0.048	0.392	11
9	171.25	171.78	-0.53	0.200	-0.028	0.000	-0.026	3
10	171.91	171.78	0.13	0.200	0.007	0.000	0.006	4
11	172.57	171.78	0.79	0.200	0.042	0.000	0.039	2
12	171.25	171.78	-0.53	0.200	-0.028	0.000	-0.026	6
13	171.91	171.78	0.13	0.200	0.007	0.000	0.006	8

* Case(s) with |Outlier T| > 3.50



1.2.5.1 Hidrofobicidad-suero

ANOVA for Response Surface Linear Model
Analysis of variance table [Partial sum of squares]

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F
Model	0.040	2	0.020	7.83	0.0090 significant
A	*0.035*	*1*	*0.035*	*13.70*	*0.0041*
B	*5.000E-003*	*1*	*5.000E-003*	*1.96*	*0.1914*
Residual	0.025	10	2.546E-003		
Lack of Fit	*0.024*	*6*	*4.003E-003*	*11.13*	*0.0177 significant*
Pure Error	*1.439E-003*	*4*	*3.596E-004*		
Cor Total	0.065	12			

The Model F-value of 7.83 implies the model is significant. There is only a 0.90% chance that a "Model F-Value" this large could occur due to noise.

The "Lack of Fit F-value" of 11.13 implies the Lack of Fit is significant. There is only a 1.77% chance that a "Lack of Fit F-value" this large could occur due to noise. Significant lack of fit is bad -- we want the model to fit.

Std. Dev.	0.050			R-Squared	0.6103
Mean	0.19		Adj R-Squared	0.5324
C.V.	26.54		Pred R-Squared	0.2035
PRESS	0.052			Adeq Precision	7.704

The "Pred R-Squared" of 0.2035 is not as close to the "Adj R-Squared" of 0.5324 as one might normally expect. This may indicate a large block effect or a possible problem with your model and/or data. Things to consider are model reduction, response tranformation, outliers,

etc.

"Adeq Precision" measures the signal to noise ratio. A ratio greater than 4 is desirable. Your ratio of 7.704 indicates an adequate signal. This model can be used to navigate the design space.

	Coefficient Factor		Standard	95% CI	95% CI	
		Estimate	DF	Error	Low	High
	VIF					
Intercept	0.19	1	0.014	0.16	0.22	
A-Potencia	0.066	1	0.018	0.026	0.11	1.00
B-Tiempo	0.025	1	0.018	-0.015	0.065	1.00

Final Equation in Terms of Coded Factors:

Hidrofobicidad-suero =
+0.19
+0.066 * A
+0.025 * B

Final Equation in Terms of Actual Factors:

Hidrofobicidad-suero =
-0.068895
+8.51917E-004 * Potencia
+7.14286E-003 * Tiempo

Standard Order	Actual Value	Predicted Value	Residual	Leverage	Student Residual	Outlier t	Cook's Distance
1	0.086	0.099	-0.014	0.327	-0.326	-0.311	0.017
2	0.17	0.23	-0.064	0.327	-1.557	-1.697	0.392
3	0.18	0.15	0.029	0.327	0.675	0.694	0.078
4	0.27	0.28	-6.665E-003	0.327	-0.161	-0.153	0.004
5	0.074	0.097	-0.022	0.327	-0.538	-0.518	0.047
6	0.32	0.28	0.039	0.327	0.930	0.936	0.142
7	0.27	0.15	0.11	0.327	4.948 *	2.704	1.184
8	0.27	0.23	0.041	0.327	0.996	0.161	

	0.995	11				
	9	0.16	0.19	-0.031	0.077	-
0.644	0.012	-0.624	3			
	10	0.16	0.19	-0.031	0.077	-
0.644	0.012	-0.624	4			
	11	0.15	0.19	-0.038	0.077	-
0.781	0.017	-0.765	2			
	12	0.20	0.19	9.915E-		
003	0.077	0.205	0.001	0.194	6	
	13	0.17	0.19	-0.023	0.077	-
0.483	0.006	-0.464	8			

* Case(s) with |Outlier T| > 3.50

1.2.6 Sineresis

Sequential Model Sum of Squares

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F
Mean	0.47	1	0.47		
Linear	0.040	2	0.020	7.83	0.0090 Suggested
2FI	6.049E-005	1	6.049E-005	0.021	0.8868
Quadratic	8.875E-003	2	4.438E-003	1.88	0.2221
Cubic	8.725E-003	2	4.363E-003	2.80	0.1530 Aliased
Residual	7.798E-003	5	1.560E-003		
Total	0.54	13	0.041		

Lack of Fit Tests

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F
Linear	0.024	6	4.003E-003	11.13	0.0177 Suggested
2FI	0.024	5	4.792E-003	13.32	0.0132
Quadratic	0.015	3	5.028E-003	13.98	0.0138
Cubic	6.359E-003	1	6.359E-003	17.68	0.0136 Aliased
Pure Error	1.439E-003	4	3.596E-004		

Model Summary Statistics

Source	Std. Dev.	R-Squared	Adjusted R-Squared	Predicted R-Squared		PRESS
Linear	0.050	0.6103	0.5324	0.2035		0.052 Suggested
2FI	0.053	0.6112	0.4817	-0.0605	0.069	
Quadratic	0.049	0.7471	0.5664	-0.6763	0.11	
Cubic	0.039	0.8806	0.7135	-5.2642	0.41	Aliased

"Model Summary Statistics": Focus on the model maximizing the "Adjusted R-

Squared"
and the "Predicted R-Squared".

Use your mouse to right click on individual cells for definitions.

Response: Sineresis

ANOVA for Response Surface Linear Model
Analysis of variance table [Partial sum of squares]

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F
Model	0.040	2	0.020	7.83	0.0090 significant
A	*0.035*	*1*	*0.035*	*13.70*	*0.0041*
B	*5.000E-003*	*1*	*5.000E-003*	*1.96*	*0.1914*
Residual	0.025	10	2.546E-003		
Lack of Fit	*0.024*	*6*	*4.003E-003*	*11.13*	*0.0177 significant*
Pure Error	*1.439E-003*	*4*	*3.596E-004*		
Cor Total	0.065	12			

The Model F-value of 7.83 implies the model is significant. There is only a 0.90% chance that a "Model F-Value" this large could occur due to noise.

Std. Dev.	0.050	R-Squared	0.6103		
Mean	0.19	Adj R-Squared	0.5324		
C.V.	26.54	Pred R-Squared	0.2035		
PRESS	0.052	Adeq Precision	7.704		

	Coefficient Factor	Estimate	Standard DF	95% CI Error	95% CI Low	95% CI High
	VIF					
Intercept	0.19	1	0.014	0.16	0.22	
A-Potencia	0.066	1	0.018	0.026	0.11	1.00
B-Tiempo	0.025	1	0.018	-0.015	0.065	1.00

Final Equation in Terms of Coded Factors:

Sineresis =
+0.19
+0.066 * A
+0.025 * B

Final Equation in Terms of Actual Factors:

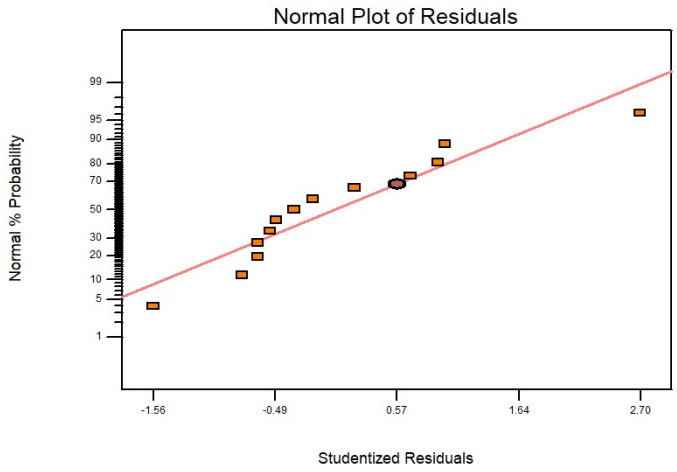
Sineresis =
-0.068895
+8.51917E-004 * Potencia
+7.14286E-003 * Tiempo

Diagnostics Case Statistics

Run	Standard Order	Actual Value	Predicted Value	Residual	Leverage	Student Residual	Cook's Distance	Outlier t	Order
1	0.086	0.099	-0.014	0.327	-				
0.326	0.017	-0.311	13						
2	0.17	0.23	-0.064	0.327	-				
1.557	0.392	-1.697	5						
3	0.18	0.15	0.029	0.327	0.694	0.078			
0.675	9								
4	0.27	0.28	-6.665E-003	0.327	-				
0.161	0.004	-0.153	12						
5	0.074	0.097	-0.022	0.327	-				
0.538	0.047	-0.518	10						
6	0.32	0.28	0.039	0.327	0.936	0.142			
0.930	7								
7	0.27	0.15	0.11	0.327	2.704	1.184			
4.948 *	1								
8	0.27	0.23	0.041	0.327	0.996	0.161			
0.995	11								
9	0.16	0.19	-0.031	0.077	-				
0.644	0.012	-0.624	3						
10	0.16	0.19	-0.031	0.077	-				
0.644	0.012	-0.624	4						
11	0.15	0.19	-0.038	0.077	-				
0.781	0.017	-0.765	2						
12	0.20	0.19	9.915E-003	0.077	0.205	0.001	0.194	6	
13	0.17	0.19	-0.023	0.077	-				
0.483	0.006	-0.464	8						

* Case(s) with |Outlier T| > 3.50

Sineresis



1.2.7 Color

Sequential Model Sum of Squares

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F	
Mean	8.97	1	8.97			
Suggested						
Linear	0.011	2	5.724E-003	0.36	0.7058	
2FI	1.000E-002	1	1.000E-002	0.61	0.4565	
Quadratic	0.075	2	0.037	3.52	0.0874	Suggested
Cubic	0.044	2	0.022	3.76	0.1008	Aliased
Residual	0.030	5	5.919E-003			
Total	9.14	13	0.70			

"Sequential Model Sum of Squares": Select the highest order polynomial where the additional terms are significant and the model is not aliased.

Lack of Fit Tests

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F	
Linear	0.15	6	0.025	10.46	0.0199	
2FI	0.14	5	0.028	11.71	0.0168	
Quadratic	0.065	3	0.022	9.06	0.0295	Suggested
Cubic	0.020	1	0.020	8.46	0.0438	Aliased
Pure Error	9.504E-003	4	2.376E-003			

"Lack of Fit Tests": Want the selected model to have insignificant lack-of-fit.

Model Summary Statistics

Source	Std. Dev.	R-Squared	Adjusted R-Squared	Predicted R-Squared		PRESS
Linear	0.13	0.0673	-0.1192	-0.7336	0.29	
2FI	0.13	0.1261	-0.1652	-1.0516	0.35	
Quadratic	0.10	0.5644	0.2532	-1.7877	0.47	
Suggested						
Cubic	0.077	0.8260	0.5824	-6.6468	1.30	Aliased

"Model Summary Statistics": Focus on the model maximizing the "Adjusted R-Squared" and the "Predicted R-Squared".

Use your mouse to right click on individual cells for definitions.

Response: Color

ANOVA for Response Surface Quadratic Model

Analysis of variance table [Partial sum of squares]

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F	
Model	0.096	5	0.019	1.81	0.2288	not significant
A	*6.407E-003*	*1*	*6.407E-003*	*0.61*	*0.4620*	
B	*5.041E-003*	*1*	*5.041E-003*	*0.48*	*0.5123*	
A^2	*0.056*	*1*	*0.056*	*5.32*	*0.0544*	
B^2	*0.027*	*1*	*0.027*	*2.56*	*0.1535*	
AB	*1.000E-002*	*1*	*1.000E-002*	*0.94*	*0.3634*	
Residual	0.074	7	0.011			
Lack of Fit	*0.065*	*3*	*0.022*	*9.06*	*0.0295*	*significant*
Pure Error	*9.504E-003*	*4*	*2.376E-003*			
Cor Total	0.17	12				

Std. Dev.	0.10	R-Squared	0.5644
Mean	0.83	Adj R-Squared	0.2532
C.V.	12.38	Pred R-Squared	-1.7877
PRESS	0.47	Adeq Precision	3.660

High	Coefficient Factor	VIF	Estimate	Standard DF	95% CI Error	95% CI Low
Intercept	0.92		1	0.046	0.82	1.03
A-Potencia	-0.028	1.00	1	0.036	-0.11	0.058
B-Tiempo	-0.025	1.00	1	0.036	-0.11	0.061
A^2	-0.090	1.02	1	0.039	-0.18	2.228E-003
B^2	-0.062	1.02	1	0.039	-0.15	0.030
AB	-0.050	1.00	1	0.051	-0.17	0.072

Final Equation in Terms of Coded Factors:

$$\text{Color} = +0.92 - 0.028 * A - 0.025 * B - 0.090 * A^2 - 0.062 * B^2 - 0.050 * A * B$$

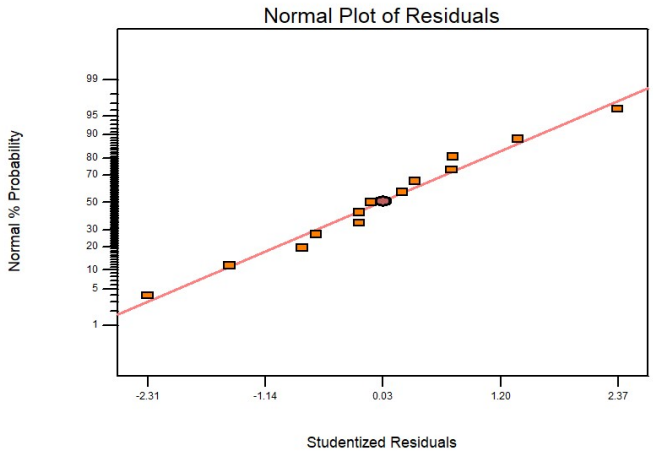
Final Equation in Terms of Actual Factors:

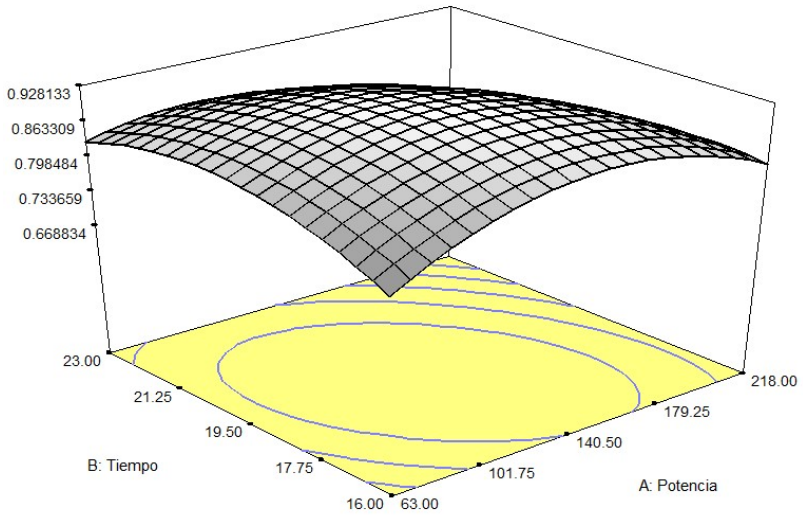
Color = -1.62300
+7.44034E-003 * Potencia
+0.21749 * Tiempo
-1.49858E-005 * Potencia^2
-5.09663E-003 * Tiempo^2
-1.84332E-004 * Potencia * Tiempo

Diagnostics Case Statistics

Run Order	Standard Order	Actual Value	Predicted Value	Residual	Leverage	Student Residual	Cook's Distance	Outlier
1	13	0.92	0.78	0.15	0.625	2.368	1.557	4.910 *
2	5	0.83	0.82	0.014	0.625	0.220	0.013	0.204
3	9	0.91	0.83	0.086	0.625	1.371	0.522	1.484
4	12	0.62	0.67	-0.049	0.625	-		0.777
5	10	0.64	0.78	-0.15	0.625	-		2.314
6	7	0.75	0.70	0.046	0.625	0.723	0.145	0.696
7	1	0.74	0.84	-0.095	0.625	-		1.500
8	11	0.76	0.76	-5.711E-003	0.625	-		0.091
9	3	0.96	0.92	0.032	0.200	0.346	0.005	0.323
10	4	0.91	0.92	-0.019	0.200	-		0.210
11	2	0.99	0.92	0.066	0.200	0.712	0.021	0.684
12	6	0.91	0.92	-0.019	0.200	-		0.210
13	8	0.87	0.92	-0.059	0.200	-		0.639

* Case(s) with |Outlier T| > 3.50





1.2.8 VALOR DE pH

Sequential Model Sum of Squares

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F	
Mean	656.51	1	656.51			
Suggested						
Linear	0.066	2	0.033	0.20	0.8204	
2FI	0.037	1	0.037	0.21	0.6595	
Quadratic	0.22	2	0.11	0.55	0.6000	
Cubic	0.096	2	0.048	0.19	0.8343	Aliased
Residual	1.28	5	0.26			
Total	658.20	13	50.63			

"Sequential Model Sum of Squares": Select the highest order polynomial where the additional terms are significant and the model is not aliased.

Lack of Fit Tests

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F	
Linear	0.41	6	0.068	0.22	0.9491	
2FI	0.37	5	0.074	0.24	0.9236	
Quadratic	0.15	3	0.051	0.17	0.9122	
Cubic	0.058	1	0.058	0.19	0.6845	Alias ed
Pure Error	1.22	4	0.30			

"Lack of Fit Tests": Want the selected model to have insignificant lack-of-fit.

Model Summary Statistics

Source	Std. Dev.	R-Squared	Adjusted R-Squared	Predicted R-Squared	PRESS	
Linear	0.40	0.0388	-0.1534	-0.3000	2.20	
2FI	0.42	0.0605	-0.2527	-0.6196	2.74	
Quadratic	0.44	0.1881	-0.3919	-0.7747	3.00	
Cubic	0.51	0.2448	-0.8124	-2.33085.64	Aliased	

"Model Summary Statistics": Focus on the model maximizing the "Adjusted R-Squared"
and the "Predicted R-Squared".

Use your mouse to right click on individual cells for definitions.

Response: pH

ANOVA for Response Surface Mean Model
Analysis of variance table [Partial sum of squares]

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F	
Model	0.000	0				
Residual	1.69	12	0.14			
Std. Dev.	0.38	R-Squared	0.0000			
Mean	7.11	Adj R-Squared	0.0000			
C.V.	5.28	Pred R-Squared	-0.1736			
PRESS	1.99			Adeq Precision		

Factor	Coefficient Estimate	DF	Standard Error	95% CI Low	95% CI High
Intercept	7.11	1	0.10	6.88	7.33

Final Equation in Terms of Coded Factors:

pH =

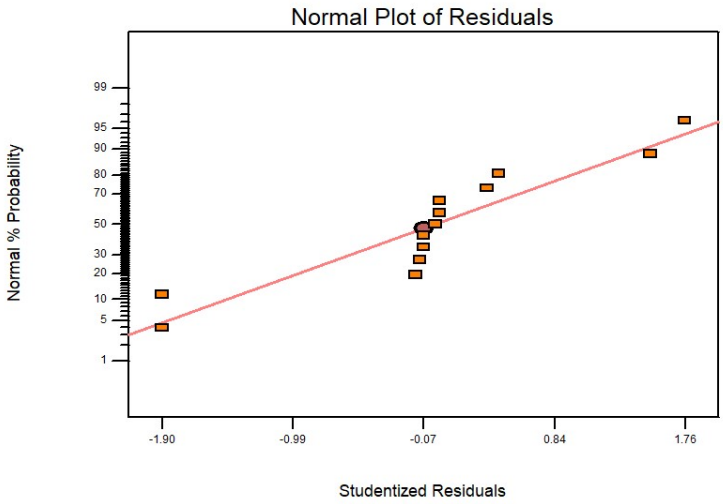
+7.11

Final Equation in Terms of Actual Factors:

pH = +7.10638

Order	Residual	Standard Student Value	Distance	Actual Cook's Value	t	Predicted Outlier Residual	Order	Run Leverage	
1	0.036	7.12	13	7.11	0.014	0.077		0.038	0.000
2	0.036	7.12	5	7.11	0.014	0.077		0.038	0.000
3	1.613	7.65	9	7.11	0.55	0.077		1.515	0.191
4	0.438	7.27	12	7.11	0.16	0.077		0.454	0.017
5	003	7.11	0.077	0.010	7.11	3.623E-0.000	0.010	10	
6	0.357	7.24	7	7.11	0.13	0.077		0.370	0.011
7	0.129	7.06	0.001	-0.123	7.11	-0.046	0.077	1	-
8	0.101	7.07	0.001	-0.097	7.11	-0.036	0.077	11	-
9	1.902	6.42	0.302	-2.179	7.11	-0.69	0.077	3	-
10	0.073	7.08	0.000	-0.070	7.11	-0.026	0.077	4	-
11	1.951	7.74	2	7.11	0.63	0.077		1.756	0.257
12	1.902	6.42	0.302	-2.179	7.11	-0.69	0.077	6	-
13	0.073	7.08	0.000	-0.070	7.11	-0.026	0.077	8	-

DESIGN-EXPERT Plot
pH



2 Anexo estadístico Capítulo 4

2.1 Analisis estadistico proceso de fermentación

2.1.1 Producción de ácido láctico en fermentación petiti suis

Response: Ye

ANOVA for Response Surface Quadratic Model

Analysis of variance table [Partial sum of squares]

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F	
Model	0.54	5	0.11	9.60	0.0049	significant
A	*0.099*	*1*	*0.099*	*8.77*	*0.0210*	
B	*2.145E-004*	*1*	*2.145E-004*	*0.019*	*0.8945*	
A^2	*0.088*	*1*	*0.088*	*7.77*	*0.0270*	
B^2	*0.29*	*1*	*0.29*	*25.17*	*0.0015*	
AB	*0.022*	*1*	*0.022*	*1.99*	*0.2017*	
Residual	0.079	7	0.011			
Lack of Fit	*0.067*	*3*	*0.022*	*7.48*	*0.0407*	*significant*
Pure Error	*0.012*	*4*	*3.000E-003*			
Cor Total	0.62	12				

Std. Dev.	0.11	R-Squared	0.8727
Mean	6.40	Adj R-Squared	0.7818
C.V.	1.66	Pred R-Squared	0.2017
PRESS	0.50	Adeq Precision	10.992 ratio of 10.992

Factor	**Coefficient Estimate**	**DF**	**Standard Error**	**95% CI Low**	**95% CI High**	**VIF**
Intercept	6.46	1	0.048	6.35	6.57	
A-Potencia	0.11	1	0.038	0.022	0.20	1.00
B-Tiempo	5.178E-003	1	0.038	-0.084	0.094	1.00
A^2	0.11	1	0.040	0.017	0.21	1.02
B^2	-0.20	1	0.040	-0.30	-0.11	1.02
AB	-0.075	1	0.053	-0.20	0.051	1.00

Final Equation in Terms of Coded Factors:

Ye =
+6.46
+0.11 *A
+5.178E-003 *B
+0.11 *A^2
-0.20 *B^2
-0.075 *A.B

Final Equation in Terms of Actual Factors:

Ye = +6.37534 -3.01085E-003 * Potencia +0.070020 * Tiempo +5.65867E-006 * $Potencia^2$ -1.67355E-003 * $Tiempo^2$ -4.83559E-005 * Potencia * Tiempo

Order	Standard Value	Actual Value	Predicted Value	Outlier Leverage	Run Residual	Student Residual	Cook's Distance
1	6.30	6.18	0.12	0.625	1.866	0.968	2.438
2	6.50	6.55	-0.051	0.625	-0.787	0.172	-0.763
3	6.40	6.34	0.061	0.625	0.941	0.246	0.932
4	6.30	6.41	-0.11	0.625	-1.713	0.815	-2.081
5	6.40	6.53	-0.13	0.625	-1.953	1.059	-2.680
6	6.96	6.84	0.12	0.625	1.800	0.900	2.273
7	6.00	6.05	-0.048	0.625	-0.731	0.149	-0.705
8	6.10	6.06	0.038	0.625	0.578	0.093	0.548
9	6.50	6.46	0.040	0.200	0.420	0.007	0.394
10	6.40	6.46	-0.060	0.200	-0.630	0.017	-0.601
11	6.40	6.46	-0.060	0.200	-0.630	0.017	-0.601
12	6.50	6.46	0.040	0.200	0.420	0.007	0.394
13	6.50	6.46	0.040	0.200	0.420	0.007	0.394

2.1.2 Parámetros weibull –Alfa

Sequential Model Sum of Squares

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F	
Mean	2.527E+005	1	2.527E+005			Suggested
Linear	111.79	2	55.89	0.93	0.4253	
2FI	267.57	1	267.57	7.25	0.0247	Suggested

Quadratic	100.65	2	50.32	1.52	0.2824
Cubic	175.94	2	87.97	7.95	0.0280 Aliased
Residual	55.33	5	11.07		
Total	2.534E+005	13	19491.45		

Lack of Fit Tests

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F
Linear	551.69	6	91.95	7.69	0.0342
2FI	284.13	5	56.83	4.76	0.0780 Suggested
Quadratic	183.48	3	61.16	5.12	0.0743
Cubic	7.53	1	7.53	0.63	0.4716 Aliased
Pure Error	47.80	4	11.95		

Model Summary Statistics

Source	Std. Dev.	Adjusted R-Squared	Predicted R-Squared	PRESS	
Linear	7.74	0.1572	-0.0114	-0.7120	1217.70
2FI	6.07	0.5333	0.3778	-0.3222	940.44 Suggested
Quadratic	5.75	0.6748	0.4426	-0.9394	1379.43
Cubic	3.33	0.9222	0.8133	0.2170	556.92 Aliased

Response: Alfa

ANOVA for Response Surface 2FI Model

Analysis of variance table [Partial sum of squares]

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F
Model	379.36	3	126.45	3.43	0.0658 not significant
A	*16.67*	*1*	*16.67*	*0.45*	*0.5183*
B	*95.12*	*1*	*95.12*	*2.58*	*0.1427*
AB	*267.57*	*1*	*267.57*	*7.25*	*0.0247*
Residual	331.93	9	36.88		

Std. Dev.	6.07	R-Squared	0.5333
Mean	139.42	Adj R-Squared	0.3778
C.V.	4.36	Pred R-Squared	-0.3222
PRESS	940.44	Adeq Precision	6.903

Factor	Coefficient Estimate	DF	Standard Error	95% CI Low	95% CI High	VIF
Intercept	139.42	1	1.68	135.61	143.23	

A-Presión	1.44	1	2.15	-3.41	6.30	1.00
B-Tiempo	-3.45	1	2.15	-8.31	1.41	1.00
AB	8.18	1	3.04	1.31	15.05	1.00

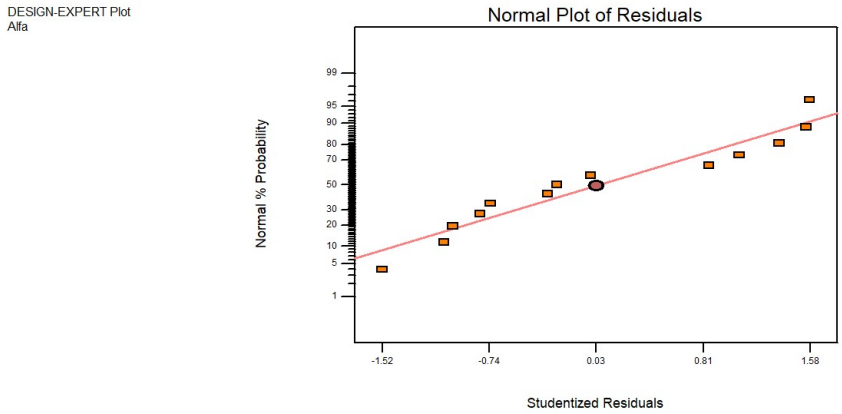
Final Equation in Terms of Coded Factors:

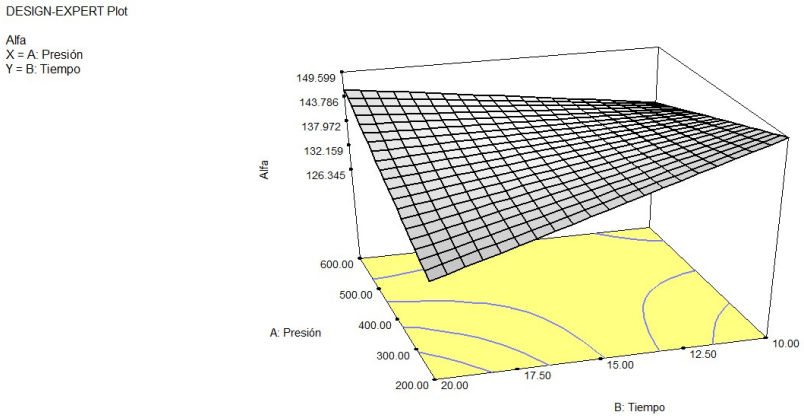
Alfa =
+139.42
+1.44 * A
-3.45 * B
+8.18 * A * B

Final Equation in Terms of Actual Factors:

Alfa =
+195.94568
-0.11546 *Presión
-3.96113 *Tiempo
+8.17875E-003Presión*Tiempo

Standard Order	Actual Value	Predicted Value	Run Order	Residual	Leverage	Student Residual	Cook's Distance	Outlier t
1	155.75	149.60	9	6.15	0.577	1.557	0.827	1.718
2	141.50	136.13	2	5.38	0.577	1.361	0.631	1.440
3	123.15	126.35	3	-3.20	0.577	-0.792	0.223	0.809
4	141.62	145.59	6	-3.97	0.577	-1.006	0.345	1.005
5	141.61	137.37	1	4.24	0.327	0.851	0.088	0.836
6	146.79	141.46	8	5.34	0.327	1.071	0.139	1.081
7	138.96	144.29	11	-5.33	0.327	-1.071	0.139	1.071
8	142.42	134.54	13	7.88	0.327	1.583	0.304	1.756
9	137.56	139.42	10	-1.85	0.077	-0.318	0.002	0.318
10	135.14	139.42	4	-4.27	0.077	-0.733	0.011	0.733
11	139.38	139.42	12	-0.041	0.077	-0.007	0.000	0.007
12	130.57	139.42	5	-8.85	0.077	-1.516	0.048	1.516
13	137.95	139.42	7.	-1.47	0.077	-0.251	0.001	0.251





2.1.3 Parámetro Weibull- Beta

Sequential Model Sum of Squares						
Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F	
Mean	86.71	1	86.71		Suggested	
Linear	1.239E-003	2	6.194E-004	5.868E-003	0.9942	
2FI	0.23	1	0.23	2.49	0.1488	
Quadratic	0.49	2	0.25	5.19	0.0415	Suggested
Cubic	0.24	2	0.12	6.51	0.0405	Aliased
Residual	0.092	5	0.018			
Total	87.77	13	6.75			

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F	
Linear	0.98	6	0.16	8.20	0.0306	
2FI	0.75	5	0.15	7.54	0.0365	
Quadratic	0.25	3	0.085	4.26	0.0975	Suggested
Cubic	0.013	1	0.013	0.66	0.4629	Aliased
Pure Error	0.079	4	0.020			

Source	Std. Dev.	Adjusted R-Squared	Predicted R-Squared		PRESS	
Linear		0.32	0.0012	-0.1986	-0.8793	1.99
2FI	0.30	0.2178	-0.0429	-1.2053	2.33	
Quadratic	0.22	0.6848	0.4597	-		
0.8247	1.93	Suggested				
Cubic	0.14	0.9126	0.7902	0.0929	0.96	Alias
ed						

Response: Beta

ANOVA for Response Surface Quadratic Model

Analysis of variance table [Partial sum of squares]

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F
Model	0.72	5	0.14	3.04	
0.0896	not significant				
A	*1.157E-005*	*1*	*1.157E-005*	*2.432E-004*	*0.9880*
B	*1.227E-003*	*1*	*1.227E-003*	*0.026*	*0.8769*
A^2	*0.45*	*1*	*0.45*	*9.46*	*0.0179*
B^2	*0.086*	*1*	*0.086*	*1.81*	*0.2200*
AB	*0.23*	*1*	*0.23*	*4.81*	*0.0643*
Residual	0.33	7	0.048		

Std. Dev.	0.22		R-Squared	0.6848
Mean	2.58		Adj R-Squared	0.4597
C.V.	8.45		Pred R-Squared	-0.8247
PRESS	1.93		Adeq Precision	4.158

	Coefficient Factor	Estimate	DF	Standard Error	95% CI Low	95% CI High	VIF
Intercept	2.36	1	0.098	2.13	2.59		
A-Presión	-1.203E-003	1	0.077	-			
0.18	0.18	1.00					
B-Tiempo	-0.012	1	0.077	-			
0.19	0.17	1.00					
A^2	0.25	1	0.083	0.059	0.45		
1.02							
B^2	0.11	1	0.083	-			
0.084	0.31	1.02					
AB	-0.24	1	0.11	-			
0.50	0.019	1.00					

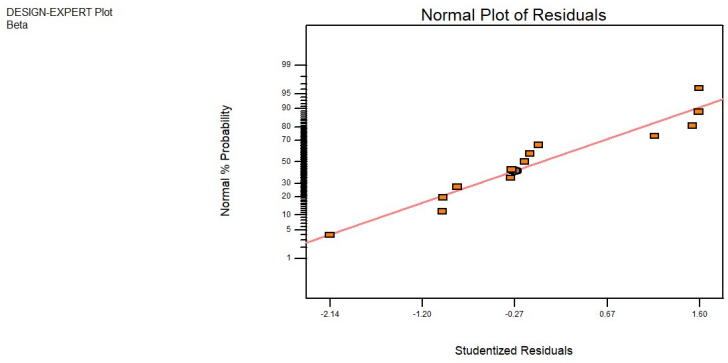
Final Equation in Terms of Coded Factors:

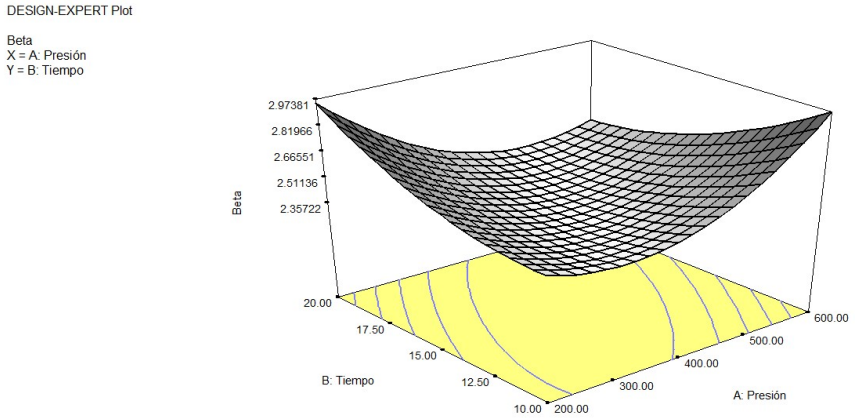
Beta	=
+2.36	
-1.203E-003	* A
-0.012	* B
+0.25	* A^2
+0.11	* B^2
-0.24	* A * B

Final Equation in Terms of Actual Factors:

Beta	=
+2.98170	
-1.50501E-003	* Presión
-0.040442	* Tiempo
+6.35969E-006	* Presión^2
+4.45550E-003	* Tiempo^2
-2.39250E-004	* Presión * Tiempo

Standard Order	Run Order	Actual Value	Predicted Value	Student Residual	Cook's Leverage	Outlier Residual	Distance
1	2.37	2.50	-0.13	0.625	-		
0.994	0.274	-0.992	9				
2	3.19	2.97	0.21	0.625	1.604	0.714	
1.866	2						
3	2.82	2.95	-0.13	0.625	-		
0.999	0.277	-0.999	3				
4	2.68	2.47	0.21	0.625	1.598	0.709	
1.856	6						
5	3.07	2.87	0.20	0.625	1.534	0.654	
1.743	1						
6	2.58	2.86	-0.29	0.625	-		
2.139	1.271	-3.363	8				
7	2.56	2.60	-0.041	0.625	-		
0.306	0.026	-0.285	11				
8	2.52	2.56	-0.040	0.625	-		
0.298	0.025	-0.278	13				
9	2.33	2.36	-0.033	0.200	-		
0.167	0.001	-0.155	10				
10	2.19	2.36	-0.17	0.200	-		
0.849	0.030	-0.830	4				
11	2.35	2.36	-4.600E-003	0.200	-		
0.024	0.000	-0.022	12				
12	2.58	2.36	0.22	0.200	1.150	0.055	
1.182	5						
13	2.34	2.36	-				





2.1.1. Parámetros Weltmann- A

Sequential Model Sum of Squares

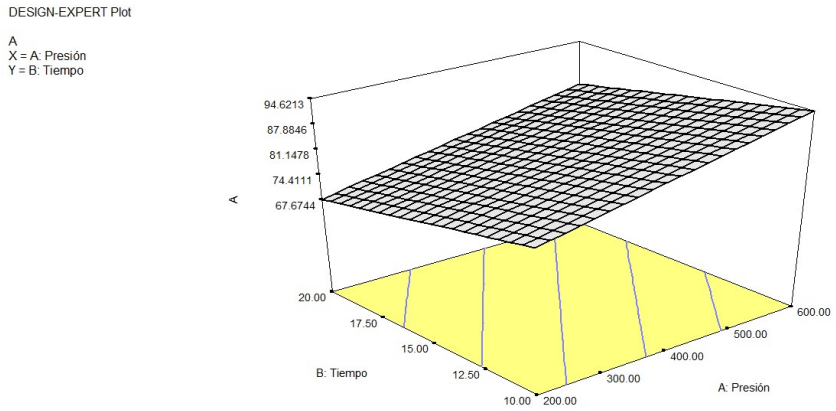
Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F	
Mean	85604.65	1	85604.65			
Suggested						
Linear	735.95	2	367.97	1.27	0.3219	Suggested
2FI	291.06	1	291.06	1.01	0.3418	
Quadratic	350.85	2	175.43	0.55	0.6022	
Cubic	956.69	2	478.35	1.85	0.2505	Aliased
Residual	1293.56	5	258.71			
Total	89232.76	13	6864.06			

Lack of Fit Tests

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F	
Linear	2539.74	6	423.29	4.80	0.0753	Suggested
2FI	2248.67	5	449.73	5.10	0.0697	
Quadratic	1897.82	3	632.61	7.18	0.0435	
Cubic	941.13	1	941.13	10.68	0.0308	Aliased

Model Summary Statistics

Source	Std. Dev.	R-Squared	Adjusted R-Squared	Predicted R-Squared	PRESS
Linear	17.01	0.2028	0.0434	-	
0.6587	6017.82	Suggested			
2FI	17.00	0.2831	0.0441	-1.3963	8694.19
Quadratic	17.93	0.3798	-0.0632	-2.8715	14046.30
Cubic	16.08	0.6435	0.1443	-	
15.7533	6078	2.93	Aliased		



2.1.4 Parametro Weltmann B textura

Response: B

Sequential Model Sum of Squares

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F
Mean	4783.42	1	4783.42		
Suggested					
Linear	137.23	2	68.61	1.36	
0.2997	Suggested				
2FI	45.62	1	45.62	0.90	0.3684
Quadratic	77.51	2	38.75	0.71	0.5225
Cubic	135.46	2	67.73	1.38	0.3327 Alias
ed					
Residual	244.96	5	48.99		
Total	5424.18	13	417.24		

Lack of Fit Tests

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F
Linear	391.84	6	65.31	2.34	0.2152 Sugg

ested					
2FI	346.23	5	69.25	2.48	0.1998
Quadratic	268.72	3	89.57	3.21	0.1448
Cubic	133.26	1	133.26	4.77	0.0943 Alias
ed					
Pure Error	111.70	4	27.92		

Model Summary Statistics

Source	Std. Dev.	R-Squared	Adjusted R-Squared	Predicted R-Squared	PRESS
	Linear	7.10	0.2142	0.0570	-
0.5505	993.52	Suggested			
2FI	7.13	0.2853	0.0471	-1.0311	1301.44
Quadratic	7.37	0.4063	-0.0177	-2.2545	2085.41
Cubic	7.00	0.6177	0.0825	-	
12.5825	8703.23	Aliased			

Response: B

ANOVA for Response Surface Linear Model

Analysis of variance table [Partial sum of squares]

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F	
Model	137.23	2	68.61	1.36		
0.2997	not significant					
A	*101.27*	*1*	*101.27*	*2.01*	*0.1865*	
B	*35.95*	*1*	*35.95*	*0.71*	*0.4179*	
Residual	503.54	10	50.35			
Lack						*of*
Fit	*391.84*	*6*	*65.31*	*2.34*	*0.2152*	*not significant*
Pure Error	*111.70*	*4*	*27.92*			
Cor Total	640.77	12				

Std. Dev.	7.10		R-Squared
Mean	-19.18	Adj R-Squared	0.0570
C.V.	-36.99	Pred R-Squared	-0.5505
PRESS	993.52		Adeq Precision
	3.331		

	Coefficient Factor	Estimate	DF	Standard Error	95% CI Low	95% CI High	VIF
Intercept	-19.18	1	1.97	-	23.57	-14.80	
A-Presión	-3.56	1	2.51	-	9.15	2.03	1.00
B-Tiempo	2.12	1	2.51	-	3.47	7.71	1.00

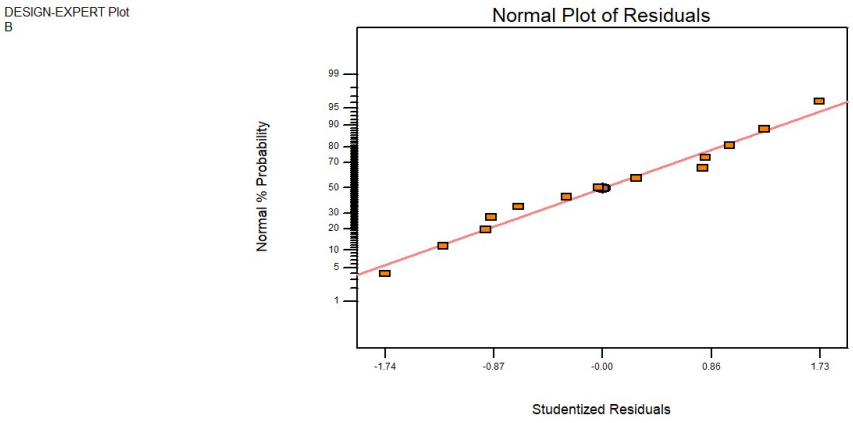
Final Equation in Terms of Coded Factors:

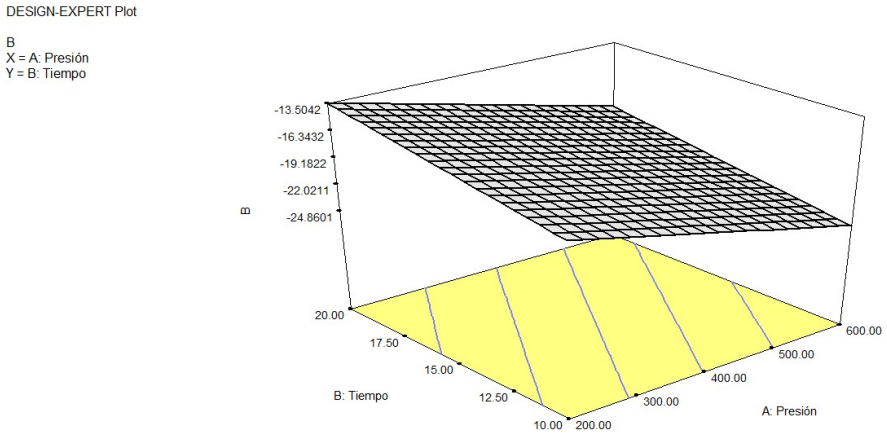
B	=
-19.18	
-3.56	* A
+2.12	* B

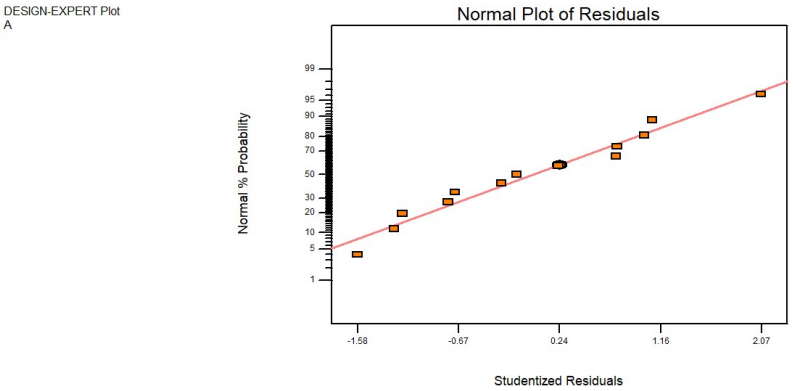
Final Equation in Terms of Actual Factors:

B	=
-18.42628	
-0.017790	* Presión
+0.42400	* Tiempo

Standard Order	Cook's Distance	Actual Outlier Value	Predicted Run Value	Residual	Leverage	Student Residual
1		-22.93	-17.74	-5.19	0.327	-
0.892	0.129	-0.882	9			
2		-28.78	-24.86	-3.92	0.327	-
0.673	0.073	-0.653	2			
3		-23.63	-13.50	-10.13	0.327	-
1.740	0.490	-1.977	3			
4		-15.97	-			
20.62	4.65	0.327	0.799	0.103	0.784	6
5		-8.25	-			
14.15	5.90	0.327	1.014	0.166	1.016	1
6		-29.66	-24.21	-5.45	0.327	-
0.936	0.142	-0.929	8			
7		-12.09	-			
22.18	10.09	0.327	1.733	0.486	1.966	11
8		-8.66	-			
16.18	7.52	0.327	1.292	0.270	1.343	13
9		-19.43	-19.18	-0.24	0.077	-
0.036	0.000	-0.034	10			
10		-13.59	-			
19.18	5.59	0.077	0.821	0.019	0.806	4
11		-21.16	-19.18	-1.97	0.077	-
0.289	0.002	-0.276	12			
12		-17.35	-			
19.18	1.83	0.077	0.269	0.002	0.256	5
13		-27.87	-19.18	-8.69	0.077	-
1.275	0.045	-1.321	7			







2.2 Analisis etadistico formulaciones teoria de mezclas

2.2.1 Aceptación sensorial

Source	Sequential Sum of Squares	Model DF	Sum of Squares Mean Square	F Value	Prob > F
Mean	214.41	1	214.41		
Linear	0.65	2	0.32	5.74	0.0196

Quadratic	0.41	3	0.14	5.13	0.0286 Suggested
Special Cubic	6.056E-003	1	6.056E-003	0.21	0.6636
Cubic	0.16	2	0.079	8.36	0.0254 Aliased
Residual	0.047	5	9.468E-003		
Total	215.68	14	15.41		

Lack of Fit Tests

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F
Linear	0.62	7	0.088	90.96	0.0003
Quadratic	0.21	4	0.052	53.75	0.0010 Suggested
Special Cubic	0.20	3	0.067	69.58	0.0007
Cubic	0.043	1	0.043	44.97	0.0026 Aliased
Pure Error	3.867E-003	4	9.667E-004		

Model Summary Statistics

Source	Std. Dev.	R-Squared	Adjusted R-Squared	Predicted R-Squared	PRESS	
Linear	0.24	0.5108	0.4219	0.2691	0.93	
Quadratic	0.16	0.8328	0.7283	0.6193	0.48	Suggested
Special Cubic	0.17	0.8376	0.6983	-0.2950	1.64	
Cubic	0.097	0.9626	0.9028	-3.115	25.21	Aliased

Response:Aceptación

ANOVA for Mixture Quadratic Model

Analysis of variance table [Partial sum of squares]

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F
Model	1.05	5	0.21	7.97	0.0057 significant
Linear Mixture	*0.65*	*2*	*0.32*	*12.22*	*0.0037*
AB	*0.39*	*1*	*0.39*	*14.64*	*0.0050*
AC	*0.020*	*1*	*0.020*	*0.75*	*0.4110*
BC	*4.999E-004*	*1*	*4.999E-004*	*0.019*	*0.8941*
Residual	0.21	8	0.026		

Std. Dev.	0.16		R-Squared	0.8328
Mean	3.91	Adj R-Squared	0.7283
C.V.	4.16	Pred R-Squared	0.6193
PRESS	0.48		Adeq Precision	8.729

Component	Coefficient Estimate	DF	Standard Error	95% CI Low	95% CI High
COAGULO	A-3.91	1	0.11	3.65	4.17
Azucar	B-3.88	1	0.11	3.62	4.14
C-Fruta	3.48	1	0.11	3.22	3.74
AB	2.04	1	0.53	0.81	3.28
AC	0.56	1	0.64	-0.92	2.03
BC	-0.088	1	0.64	-1.56	1.39

Final Equation in Terms of Pseudo Components:

Aceptación =
+3.91 * A
+3.88 * B
+3.48 * C
+2.04 * A * B
+0.56 * A * C
-0.088 * B * C

Final Equation in Terms of Real Components:

Aceptación =
-7.97358 * COAGULO
-384.46531 * Azucar
-78.43483 * Fruta
+567.66946 * COAGULO * Azucar
+154.25887 * COAGULO * Fruta
-24.44454 * Azucar * Fruta

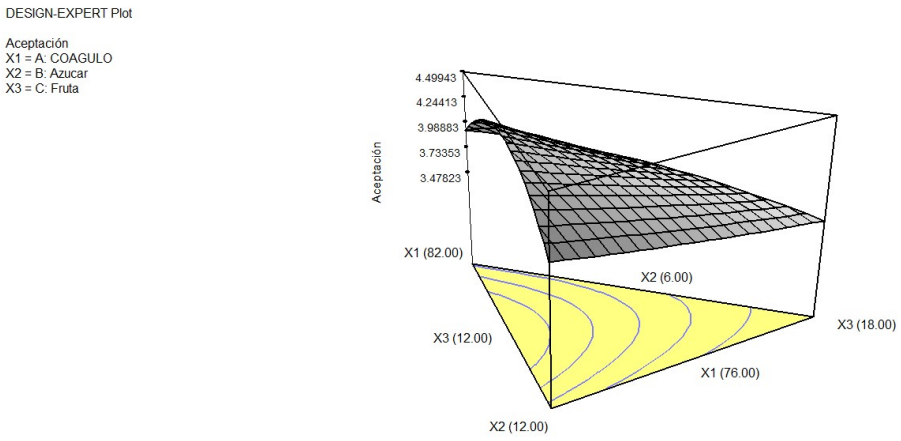
Final Equation in Terms of Actual Components:

Aceptación =
-0.079736 * COAGULO
-3.84465 * Azucar
-0.78435 * Fruta
+0.056767 * COAGULO * Azucar
+0.015426 * COAGULO * Fruta
-2.44445E-003 * Azucar * Fruta

Standard Order	Actual Value	Predicted Value	Residual	Leverage	Student Residual	Outlier t	Run Order	Cook's Distance
1	3.90	3.88	0.023	0.482	0.192	0.006	5	0.180
2	3.73	3.83	-0.10	0.715	-1.189	0.591	4	-1.226
3	4.46	4.41	0.056	0.423	0.450	0.025		

	0.426	14						
	4	3.91	3.91	-4.887E-003	0.482		-	
0.042	0.000	-0.039	12					
	5	3.45	3.48	-0.024	0.481		-	
0.202	0.006	-0.190	7					
	6	3.68	3.66	0.025	0.715		0.285	0.034
	0.268	11						
	7	3.85	3.73	0.13	0.222		0.886	0.037
	0.873	8						
	8	4.14	4.12	0.014	0.195		0.098	0.000
	0.092	13						
	9	3.68	4.05	-0.37	0.195		-	
2.532	0.259	-5.318 *	6					
	10	4.22	4.04	0.18	0.223		1.277	0.078
	1.339	9						
	11	3.98	3.88	0.096	0.482		0.817	0.103
	0.798	3						
	12	3.45	3.48	-0.024	0.481		-	
0.202	0.006	-0.190	10					
	13	3.91	3.91	-4.887E-003	0.482		-	
0.042	0.000	-0.039	1					
	14	4.41	4.41	6.779E-				
003	0.423	0.055	0.000	0.051	2			

* Case(s) with |Outlier T| > 3.50



2.2.2 Calificación promedio

Mean	229.24	1	229.24		
Linear	0.40	2	0.20	12.51	0.0015
Quadratic	0.15	3	0.049	12.85	0.0020
Suggested					

Special Cubic	1.505E-003	1	1.505E-003	0.36	0.5652	
Cubic	0.023	2	0.011	9.51	0.0198	Aliased
Residual	6.019E-003	5	1.204E-003			
Total	229.82	14	16.42			

Lack of Fit Tests

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F	
Linear	0.18	7	0.025	93.66	0.0003	
Quadratic	0.029	4	7.337E-003	27.34	0.0036	Suggested
Special Cubic	0.028	3	9.280E-003	34.59	0.0026	
Cubic	4.946E-003	1	4.946E-003	18.43	0.0127	Aliased
Pure Error	1.073E-003	4	2.683E-004			

Model Summary Statistics

Source	Std. Dev.	R-Squared	Adjusted R-Squared	Predicted R-Squared	PRESS	
Linear	0.13	0.6947	0.6392	0.4931	0.29	
Quadratic	0.062	0.9475	0.9147	0.8794	0.070	Suggested
Special Cubic	0.064	0.9501	0.9074	0.6204	0.22	
Cubic	0.035	0.9896	0.9730	-		
0.0269	0.60	Aliased				

Response:Promedio

ANOVA for Mixture Quadratic Model

Analysis of variance table [Partial sum of squares]

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F	
Model	0.55	5	0.11	28.89	< 0.0001	significant
Linear Mixture	*0.40*	*2*	*0.20*	*52.95*	*< 0.0001*	
AB	*0.096*	*1*	*0.096*	*25.30*	*0.0010*	
AC	*0.048*	*1*	*0.048*	*12.66*	*0.0074*	
BC	*4.074E-004*	*1*	*4.074E-004*	*0.11*	*0.7518*	
Residual	0.030	8	3.802E-003			
Std. Dev.	0.062		R-Squared	0.9475		
Mean	4.05		Adj R-Squared	0.9147		
C.V.	1.52		Pred R-Squared	0.8794		
PRESS	16.530		0.070		Adeq Precision	

.

Component	Coefficient Estimate	DF	Standard Error	95% CI Low	95% CI High
A-COAGULO	4.07	1	0.043	3.97	4.17
B-Azucar	4.07	1	0.043	3.97	4.17
C-Fruta	3.66	1	0.043	3.56	3.76
AB	1.02	1	0.20	0.55	1.49
AC	0.86	1	0.24	0.30	1.42

BC	0.079	1	0.24	-0.48	0.64

Final Equation in Terms of Pseudo Components:

Promedio	=
+4.07	* A
+4.07	* B
+3.66	* C
+1.02	* A * B
+0.86	* A * C
+0.079	* B * C

Final Equation in Terms of Real Components:

Promedio	=
-5.94187	* COAGULO
-177.73550	* Azucar
-150.60647	* Fruta
+282.90057	* COAGULO * Azucar
+239.82692	* COAGULO * Fruta
+22.06715	* Azucar * Fruta

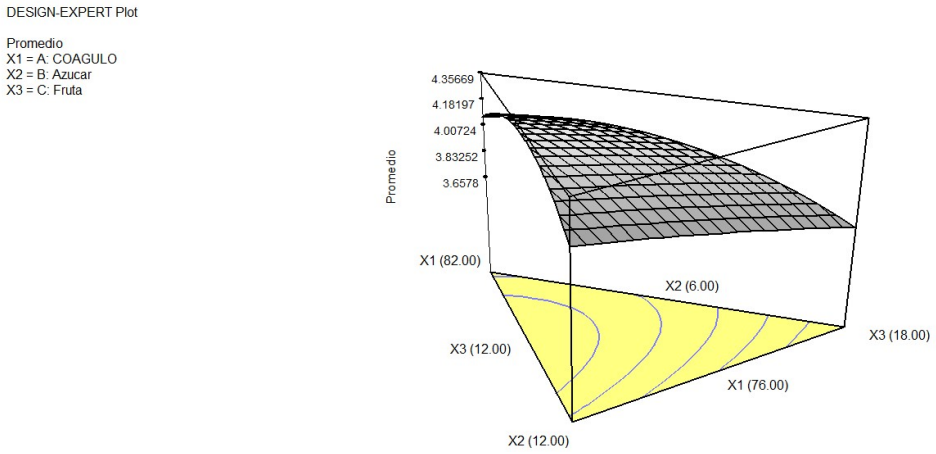
Final Equation in Terms of Actual Components:

Promedio	=
-0.059419	* COAGULO
-1.77735	* Azucar
-1.50606	* Fruta
+0.028290	* COAGULO * Azucar
+0.023983	* COAGULO * Fruta
+2.20672E-003	* Azucar * Fruta

Order	Value	Value	Residual	Leverage	Residual	Distance
1	4.11	4.07	0.036	0.482	0.813	0.102
0.794	5					
2	4.07	4.08	-9.295E-003	0.715	-0.282	
0.033	-0.265	4				
3	4.35	4.33	0.024	0.423	0.504	0.031
0.479	14					
4	4.07	4.07	6.962E-003	0.482	0.157	
0.004	0.147	12				
5	3.66	3.66	-7.370E-004	0.481	-0.017	
0.000	-0.016	7				
6	3.92	3.89	0.037	0.715	1.118	0.523
1.138	11					
7	3.98	3.93	0.047	0.222	0.868	0.036
0.853	8					
8	4.20	4.21	-0.011	0.195	-	

0.202	0.002	-0.190	13				
	9	4.00	4.15	-0.15	0.195	-	
2.702	0.295	-8.536 *	6				
	10	4.17	4.15	0.022	0.223	0.409	0.008
	0.387	9					
	11	4.08	4.07	3.582E-			
003	0.482	0.081	0.001	0.076	3		
	12	3.63	3.66	-0.025	0.481	-	
0.566	0.049	-0.540	10				
	13	4.05	4.07	-0.013	0.482	-	
0.301	0.014	-0.283	1				
	14	4.36	4.33	0.033	0.423	0.696	0.059
	0.672	2					

* Case(s) with |Outlier T| > 3.50



2.2.3 Color

Response: Color

Source	Sequential Sum of Squares	DF	Model Sum of Squares Mean Square	F Value	Prob > F
Mean	209.19	1	209.19		
Linear	0.71	2	0.36	3.57	
0.0637					
Quadratic	0.99	3	0.33	23.36	
0.0003					
Special Cubic	0.043	1	0.043	4.40	0.0742 Suggested
Cubic	0.022	2	0.011	1.16	0.3847 Aliased
Residual	0.047	5	9.430E-003		
Total	211.00	14	15.07		

Lack of Fit Tests

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F
Linear	1.08	7	0.15	36.31	0.0018

Quadratic	0.095	4	0.024	5.61	0.0617
Special Cubic	0.052	3	0.017	4.08	0.1039 Suggested
Cubic	0.030	1	0.030	7.09	0.0563 Aliased
Pure Error	0.017	4	4.253E-003		

Model Summary Statistics

Source	Std. Dev.	R-Squared	Adjusted R-Squared	Predicted R-Squared	PRESS	
Linear	0.32	0.3939	0.2837	-0.0353	1.88	
Quadratic	0.12	0.9379	0.8991	0.7056	0.53	
Special Cubic	0.099	0.9619	0.9292	0.6497	0.63	Suggested
Cubic	0.097	0.9740	0.9323	-1.025	43.67	Aliased

Response: Color

ANOVA for Mixture Special Cubic Model

Analysis of variance table [Partial sum of squares]

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F	
Model	1.74	6	0.29	29.42	0.0001	significant
Linear Mixture	*0.71*	*2*	*0.36*	*36.15*	*0.0002*	
AB	*0.19*	*1*	*0.19*	*19.03*	*0.0033*	
AC	*0.77*	*1*	*0.77*	*78.42*	*< 0.0001*	
BC	*0.053*	*1*	*0.053*	*5.37*	*0.0536*	
ABC	*0.043*	*1*	*0.043*	*4.40*	*0.0742*	
Residual	0.069	7	9.870E-003			
Lack of Fit	*0.052*	*3*	*0.017*	*4.08*	*0.1039*	*not significant*
Pure Error	*0.017*	*4*	*4.253E-003*			
Cor Total	1.81	13				

Std. Dev.	0.099		R-Squared 0.9619
Mean	3.87	Adj R-Squared	0.9292
C.V.	2.57	Pred R-Squared	0.6497
PRESS	0.63		Adeq Precision 18.420

Component	Coefficient Estimate	DF	Standard Error	95% CI Low	95% CI High
A-COAGULO	3.81	1	0.069	3.65	3.98
B-Azucar	3.79	1	0.069	3.63	3.96
C-Fruta	3.16	1	0.069	2.99	3.32

AB	1.50	1	0.34	0.68	2.31
AC	3.86	1	0.44	2.83	4.89
BC	1.01	1	0.44	-0.021	2.04
ABC	-6.33	1	3.02	-13.47	0.81

Final Equation in Terms of Pseudo Components:

Color	=
+3.81	* A
+3.79	* B
+3.16	* C
+1.50	* A * B
+3.86	* A * C
+1.01	* B * C
-6.33	* A * B * C

Final Equation in Terms of Real Components:

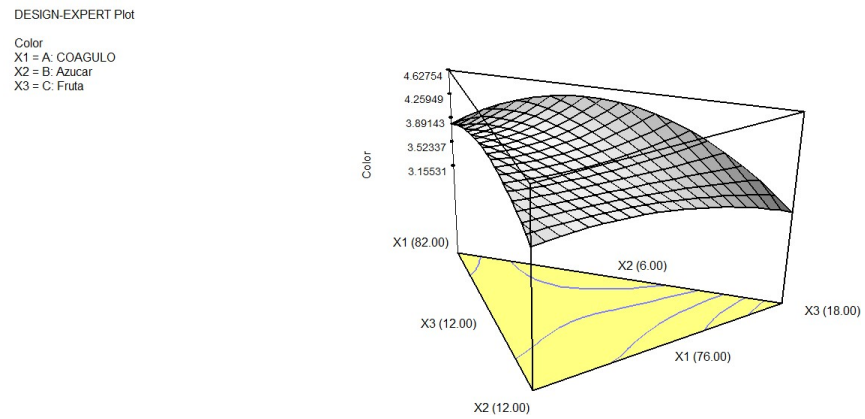
Color	=
-80.35324	* COAGULO
-2739.06629	* Azucar
-1895.20164	* Fruta
+3933.41397	* COAGULO * Azucar
+2831.21778	* COAGULO * Fruta
+22560.79518	* Azucar * Fruta
-29316.13209	* COAGULO * Azucar * Fruta

Final Equation in Terms of Actual Components:

Color	=
-0.80353	* COAGULO
-27.39066	* Azucar
-18.95202	* Fruta
+0.39334	* COAGULO * Azucar
+0.28312	* COAGULO * Fruta
+2.25608	* Azucar * Fruta
-0.029316	* COAGULO * Azucar * Fruta

Order	**Value**	**Value**	**Residual**	**Leverage**	**Residual**	
Distance	**t**	**Order**				
1	3.85	3.79	0.060	0.483	0.842	0.094
0.822	5					
2	4.44	4.45	-0.010	0.917	-	
0.358 0.202	-0.335	4				
3	4.21	4.18	0.037	0.478	0.515	0.035
0.486	14					
4	3.88	3.81	0.065	0.483	0.907	0.110
0.894	12					
5	3.20	3.16	0.040	0.483	0.557	0.041
0.528	7					
6	3.78	3.73	0.054	0.917	1.869	5.491

	2.445	11					
	7	3.78	3.84	-0.056	0.242	-	
0.650	0.019	-0.621	8				
	8	4.22	4.21	0.013	0.238	0.154	0.001
	0.143	13					
	9	3.78	3.96	-0.18	0.238	-	
2.056	0.189	-3.026	6				
	10	4.17	4.06	0.11	0.596	1.751	0.646
	2.163	9					
	11	3.78	3.79	-0.013	0.483	-	
0.182	0.004	-0.169	3				
	12	3.12	3.16	-0.033	0.483	-	
0.467	0.029	-0.439	10				
	13	3.73	3.81	-0.082	0.483	-	
1.141	0.174	-1.171	1				
	14	4.17	4.18	-6.571E-003	0.478	-	
0.092	0.001	-0.085	2				



2.2.4 Aroma

Response: Aroma

Source	Sequential Sum of Squares	DF	Mean Square	Model F Value	Sum of Squares Prob > F	
Mean	254.99	1	254.99			
Suggested						
Linear	2.933E-003	2	1.467E-003	0.40	0.6773	
Quadratic	6.779E-003	3	2.260E-003	0.54	0.6652	
Special Cubic	0.016	1	0.016	6.19	0.0417	Suggested
Cubic	1.881E-003	2	9.404E-004	0.30	0.7539	
Aliased						
Residual	0.016	5	3.144E-003			
Total	255.03	14	18.22			

Lack of Fit Tests

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F	
Linear	0.036	7	5.199E-003	5.83	0.0539	
Quadratic	0.030	4	7.403E-003	8.30	0.0322	
Special Cubic	0.014	3	4.678E-003	5.24	0.0717	Suggested
Cubic	0.012	1	0.012	13.62	0.0210	Aliased
Pure Error	3.569E-003	4	8.923E-004			

Model Summary Statistics

Source	Std. Dev.	R-Squared	Adjusted R-Squared	Predicted R-Squared	PRESS	
Linear	0.060	0.0684	-0.1010	-0.2625	0.054	
Quadratic	0.064	0.2264	-0.2570	-1.3747	0.10	
Special Cubic		0.050	0.5896	0.2378	-2.3695	0.14 Suggested
Cubic	0.056	0.6335	0.0470	-33.1881	1.47	Aliased

Response: Aroma

ANOVA for Mixture Special Cubic Model

Analysis of variance table [Partial sum of squares]

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F	
Model	0.025	6	4.215E-003	1.68	0.2569	not significant
Linear Mixture	*2.933E-003*	*2*	*1.467E-003*	*0.58*	*0.5831*	
AB	*0.011*	*1*	*0.011*	*4.31*	*0.0766*	
AC	*3.692E-003*	*1*	*3.692E-003*	*1.47*	*0.2649*	
BC	*2.162E-004*	*1*	*2.162E-004*	*0.086*	*0.7779*	
ABC	*0.016*	*1*	*0.016*	*6.19*	*0.0417*	
Residual	0.018	7	2.515E-003			

Std. Dev.	0.050		R-Squared 0.5896
Mean	4.27	Adj R-Squared	0.2378
C.V.	1.18	Pred R-Squared	-2.3695
PRESS	0.14		Adeq Precision 4.461

Component	Coefficient Estimate	DF	Standard Error	95% CI Low	95% CI High
A-COAGULO	4.25	1	0.035	4.17	4.34
B-Azucar	4.27	1	0.035	4.19	4.35
C-Fruta	4.25	1	0.035	4.16	4.33
AB	0.36	1	0.17	-0.050	0.77
AC	0.27	1	0.22	-0.25	0.79
BC	0.065	1	0.22	-0.46	0.58
ABC	-3.79	1	1.52	-7.40	-0.19

Final Equation in Terms of Pseudo Components:

Aroma	=
+4.25	* A
+4.27	* B
+4.25	* C
+0.36	* A * B
+0.27	* A * C
+0.065	* B * C
-3.79	* A * B * C

Final Equation in Terms of Real Components:

Aroma	=
-29.54127	* COAGULO
-1567.79287	* Azucar
-746.60032	* Fruta
+2207.48514	* COAGULO * Azucar
+1127.91573	* COAGULO * Fruta
+13366.79438	* Azucar * Fruta
-17564.30704	* COAGULO * Azucar * Fruta

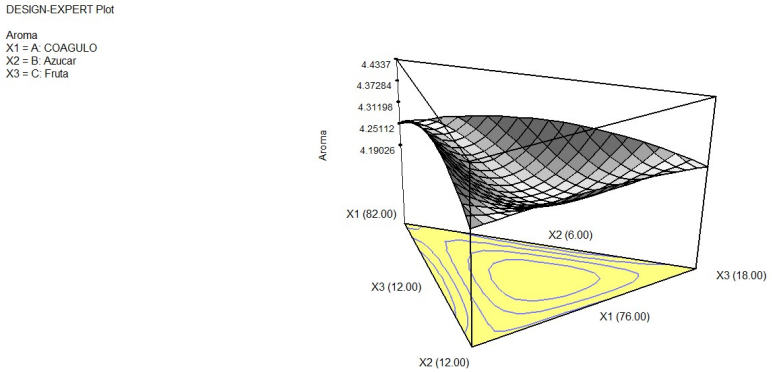
Final Equation in Terms of Actual Components:

Aroma	=
-0.29541	* COAGULO
-15.67793	* Azucar
-7.46600	* Fruta
+0.22075	* COAGULO * Azucar
+0.11279	* COAGULO * Fruta
+1.33668	* Azucar * Fruta
-0.017564	* COAGULO * Azucar * Fruta

	Order t	Value Order	Value	Residual	Leverage	Residual	Distance
	1	4.27	4.27	2.201E-005			
004	0.483	0.006	0.000	0.006			
	2	4.29	4.32	-0.024	0.917	-	
1.646	4.259	-1.947	4				
	3	4.37	4.35	0.016	0.478	0.429	0.024
	0.403	14					
	4	4.22	4.25	-0.033	0.483	-	
0.928	0.115	-0.917	12				
	5	4.27	4.25	0.022	0.483	0.597	0.048
	0.568	7					
	6	4.27	4.27	-5.245E-003	0.917	-	
0.362	0.206	-0.339	11				

	7	4.27	4.23	0.040	0.242	0.926	0.039
0.915	8						
	8	4.33	4.26	0.078	0.238	1.778	0.141
2.223	13						
	9	4.27	4.25	0.022	0.238	0.504	0.011
0.476	6						
	10	4.12	4.19	-0.070	0.596	-	
2.201	1.020	-3.672 *	9				
	11	4.27	4.27	2.201E-			
004	0.483	0.006	0.000	0.006	3		
	12	4.22	4.25	-0.027	0.483	-	
0.755	0.076	-0.729	10				
	13	4.27	4.25	0.015	0.483	0.425	0.024
0.398	1						
	14	4.32	4.35	-0.033	0.478	-	
0.918	0.110	-0.906	2				

* Case(s) with |Outlier T| > 3.50



2.2.5 Sabor

	Mean	242.62	1	242.62		
	Linear	0.70	2	0.35	18.13	
0.0003						
	Quadratic	0.13	3	0.044	4.38	
0.0420Suggested						
Special Cubic	0.011	1	0.011	1.06	0.3364	
Cubic	0.037	2	0.019	2.86	0.1488	Alias
ed						
Residual	0.032	5	6.486E-003			
Total	243.53	14	17.40			

Lack of Fit Tests

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F	
Linear	0.20	7	0.029	17.10	0.0078	
Quadratic	0.073	4	0.018	10.70	0.0207	Sugg
ested						

Special Cubic	0.063	3	0.021	12.21	0.0176	
Cubic	0.026	1	0.026	14.96	0.0180	Aliased
Pure Error	6.841E-003	4	1.710E-003			

Model Summary Statistics

Source	Std. Dev.	R-Squared	Adjusted R-Squared	Predicted R-Squared	PRESS	
Linear	0.14	0.7672	0.7249	0.6303	0.34	
Quadratic	0.10	0.9119	0.8569	0.6341	0.33	Suggested
Special Cubic	0.100	0.9236	0.8580	0.1149	0.80	
Cubic	0.081	0.9643	0.9072	-2.3939	3.08	Aliased

Response:Sabor

ANOVA for Mixture Quadratic Model

Analysis of variance table [Partial sum of squares]

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F	
Model	0.83	5	0.17	16.57	0.0005	significant
Linear Mixture	*0.70*	*2*	*0.35*	*34.85*	*0.0001*	
AB	*0.099*	*1*	*0.099*	*9.90*	*0.0137*	
AC	*0.032*	*1*	*0.032*	*3.23*	*0.1103*	
BC	*2.104E-004*	*1*	*2.104E-004*	*0.021*	*0.8883*	
Residual	0.080	8	0.010			
Lack of Fit	*0.073*	*4*	*0.018*	*10.70*	*0.0207*	*significant*
Pure Error	*6.841E-003*	*4*	*1.710E-003*			
Cor Total	0.91	13				

Std. Dev.	0.10		R-Squared
Mean	4.16	Adj R-Squared	0.8569
C.V.	2.40	Pred R-Squared	0.6341
PRESS	0.33		Adeq Precision
	11.685		

Component	Coefficient Estimate	DF	Standard Error	95% CI Low	95% CI High
A-COAGULO	4.06	1	0.069	3.90	4.22
B-Azucar	4.39	1	0.069	4.23	4.55
C-Fruta	3.72	1	0.069	3.56	3.88
AB	1.03	1	0.33	0.28	1.79
AC	0.71	1	0.39	-0.20	1.61
BC	-0.057	1	0.39	-0.96	0.85

Final Equation in Terms of Pseudo Components:

Sabor	=
+4.06	* A
+4.39	* B
+3.72	* C
+1.03	* A * B
+0.71	* A * C
-0.057	* B * C

Final Equation in Terms of Real Components:

Sabor	=
-5.48404	* COAGULO
-175.46733	* Azucar
-118.71019	* Fruta
+287.04681	* COAGULO * Azucar
+196.39420	* COAGULO * Fruta
-15.85900	* Azucar * Fruta

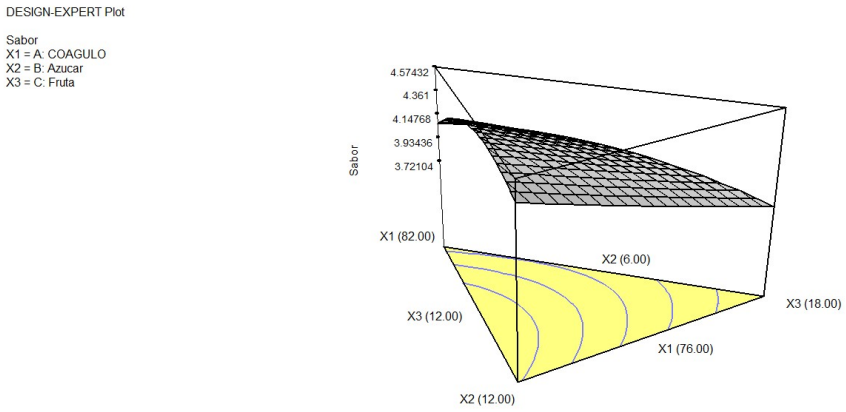
Final Equation in Terms of Actual Components:

Sabor	=
-0.054840	* COAGULO
-1.75467	* Azucar
-1.18710	* Fruta
+0.028705	* COAGULO * Azucar
+0.019639	* COAGULO * Fruta
-1.58590E-003	* Azucar * Fruta

Order		Value	Value	Residual	Leverage	Residual	
Distance		t	Order				
	1	4.44	4.39	0.047	0.482	0.649	0.065
	0.624	5					
	2	3.98	4.07	-0.093	0.715	-	
1.750	1.281	-2.083	4				
	3	4.44	4.49	-0.047	0.423	-	
0.621	0.047	-0.596	14				
	4	4.05	4.06	-0.015	0.482	-	
0.205	0.007	-0.192	12				
	5	3.71	3.72	-0.014	0.481	-	
0.190	0.006	-0.178	7				
	6	3.95	4.04	-0.092	0.715	-	
1.730	1.253	-2.046	11				
	7	4.22	3.99	0.23	0.222	2.591	0.320
	6.046 *	8					
	8	4.27	4.25	0.015	0.195	0.170	0.001
	0.159	13					
	9	4.37	4.35	0.012	0.195	0.135	0.001

	0.127	6					
	10	4.21	4.25	-0.037	0.223	-	
0.416	0.008	-0.393	9				
	11	4.37	4.39	-0.026	0.482	-	
0.367	0.021	-0.346	3				
	12	3.68	3.72	-0.038	0.481	-	
0.529	0.043	-0.503	10				
	13	4.10	4.06	0.034	0.482	0.473	0.035
	0.448	1					
	14	4.51	4.49	0.026	0.423	0.341	0.014
	0.322	2					

* Case(s) with |Outlier T| > 3.50



2.2.6 Textura

Source	Sequential Sum of Squares	Model DF	Mean Square	F Value	Prob > F	Sum of Squares
Mean	213.78	1	213.78			
Linear	0.42	2	0.21	29.73	< 0.0001	Suggested
Quadratic	0.043	3	0.014	3.38	0.0750	
Special Cubic	8.746E-004	1	8.746E-004	0.18	0.6807	
Cubic	8.261E-003	2	4.130E-003	0.83	0.4896	Aliased
Residual	0.025	5	4.997E-003			
Total	214.27	14	15.31			

Lack of Fit Tests

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F
Linear	0.067	7	9.642E-003	3.93	0.1020	Suggested
Quadratic	0.024	4	6.076E-003	2.48	0.2007	
Special Cubic	0.023	3	7.810E-003	3.18	0.1464	

Cubic	0.015	1	0.015	6.18	0.0678 Aliased
Pure Error	9.816E-003	4	2.454E-003		

Model Summary Statistics

Source	Std. Dev.	R-Squared	Adjusted R-Squared	Predicted R-Squared	PRESS
Linear	0.12	0.084	0.8439	0.8155	0.7650 Suggested
Quadratic	0.065	0.9311	0.8880	0.8331	0.083
Special Cubic	0.069	0.9329	0.8753	0.5082	0.24
Cubic	0.071	0.9495	0.8688	-2.7395	1.85 Aliased

Response:Textura

ANOVA for Mixture Linear Model

Analysis of variance table [Partial sum of squares]

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F
Model	0.42	2	0.21	29.73	< 0.0001 significant
Linear Mixture	*0.42*	*2*	*0.21*	*29.73*	*< 0.0001*
Residual	0.077	11	7.028E-003		
Lack of Fit	*0.067*	*7*	*9.642E-003*	*3.93*	*0.1020 not significant*
Pure Error	*9.816E-003*	*4*	*2.454E-003*		
Cor Total	0.50	13			

Std. Dev.	0.084			R-Squared	0.8439
Mean	3.91		Adj R-Squared	0.8155
C.V.	2.15		Pred R-Squared	0.7650
PRESS	14.020			Adeq Precision	0.12

Component	Coefficient Estimate	DF	Standard Error	95% CI Low	95% CI High
A-COAGULO	4.22	1	0.048	4.12	4.33
B-Azucar	3.80	1	0.048	3.70	3.91
C-Fruta	3.68	1	0.049	3.57	3.78

Component	Adjusted Effect	DF	Adjusted Approx t for H_0 Std Error	Effect=0	Prob > |t|
A-COAGULO	0.48	1	0.064	7.47	< 0.0001
B-Azucar	-0.15	1	0.064	-2.29	0.0430
C-Fruta	-0.33	1	0.063	-5.31	

Final Equation in Terms of Pseudo Components:

Textura	=
+4.22	* A
+3.80	* B
+3.68	* C

Final Equation in Terms of Real Components:

Textura	=
+5.72864	* COAGULO
-1.26323	* Azucar
-3.33986	* Fruta

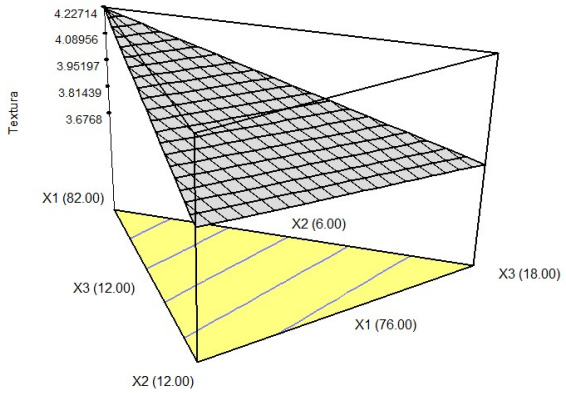
Final Equation in Terms of Actual Components:

Textura	=
+0.057286	* COAGULO
-0.012632	* Azucar
-0.033399	* Fruta

Order		Value	Value	Residual	Leverage	Residual	
Distance		t	Order				
	1	3.85	3.80	0.052	0.326	0.759	0.093
	0.743	5					
	2	3.85	3.95	-0.095	0.142	-	
1.226	0.083	-1.258	4				
	3	4.10	4.01	0.086	0.126	1.102	0.058
	1.114	14					
	4	4.22	4.22	-1.400E-003	0.326	-	
0.020	0.000	-0.019	12				
	5	3.73	3.68	0.055	0.341	0.807	0.112
	0.793	7					
	6	3.68	3.74	-0.056	0.142	-	
0.723	0.029	-0.707	11				
	7	3.73	3.79	-0.057	0.143	-	
0.729	0.030	-0.712	8				
	8	4.05	4.06	-0.012	0.133	-	
0.148	0.001	-0.141	13				
	9	3.73	3.85	-0.12	0.133	-	
1.522	0.118	-1.634	6				
	10	3.98	3.90	0.076	0.072	0.940	0.023
	0.934	9					
	11	3.73	3.80	-0.070	0.326	-	
1.012	0.165	-1.013	3				
	12	3.73	3.68	0.055	0.341	0.807	0.112
	0.793	10					
	13	4.17	4.22	-0.050	0.326	-	
0.729	0.085	-0.712	1				
	14	4.15	4.01	0.14	0.126	1.724	0.142
	1.925	2					

DESIGN-EXPERT Plot

Textura
X1 = A: COAGULO
X2 = B: Azucar
X3 = C: Fruta



2.2.7 Dulzor

Source	Sequential Sum of Squares	Model Mean DF	F Square	Sum of Squares Value	Prob > F	
Mean	242.51	1	242.51			
Linear	0.86	2	0.43	19.89	0.0002	
Quadratic	0.16	3	0.055	5.99	0.0192	Suggested
Special Cubic	0.012	1	0.012	1.39	0.2773	
Cubic	0.023	2	0.011	1.51	0.3061	Aliased
Residual	0.038	5	7.581E-003			
Total	243.61	14	17.40			

Lack of Fit Tests

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F	
Linear	0.23	7	0.033	44.92	0.0012	
Quadratic	0.070	4	0.017	23.52	0.0049	Suggested
Special Cubic	0.058	3	0.019	25.95	0.0044	
Cubic	0.035	1	0.035	46.97	0.0024	Aliased
Pure Error	2.974E-003	4	7.436E-004			

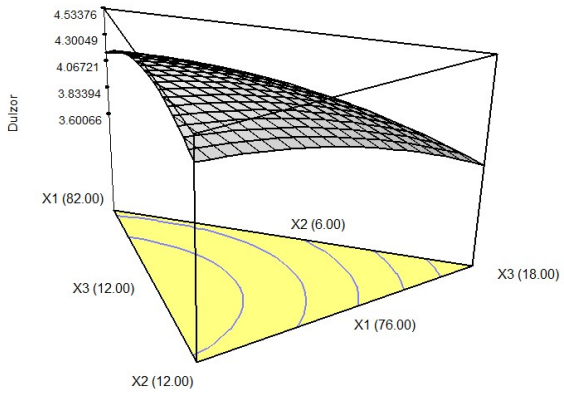
Model Summary Statistics

Source	Std. Dev.	R-Squared	Adjusted R-Squared	Predicted R-Squared	PRESS	
Linear	0.15	0.7833	0.7439	0.6491	0.38	
Quadratic	0.095	0.9333	0.8916	0.8095	0.21	Suggested
Special Cubic	0.093	0.9443	0.8966	0.7569	0.27	
Cubic	0.087	0.9653	0.9098	-		

2.82984.19Aliased

DESIGN-EXPERT Plot

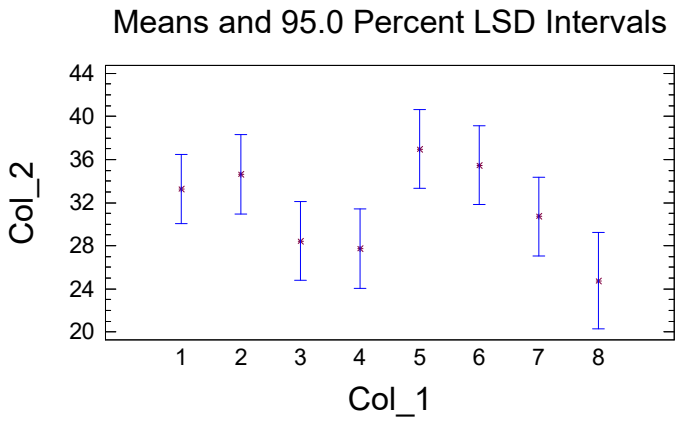
Dulzor
X1 = A: COAGULO
X2 = B: Azucar
X3 = C: Fruta



3 Anexo estadístico capítulo 5

3.1 Estadística comportamiento reológico de geles de WPI

3.1.1 Estadísticos para G*



ANOVA Table for Col_2 by Col_1

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	340.328	7	48.6182	2.70	0.0471
Within groups	287.652	16	17.9782		
Total (Corr.)	627.979	23			

Multiple Range Tests for Col_2 by Col_1

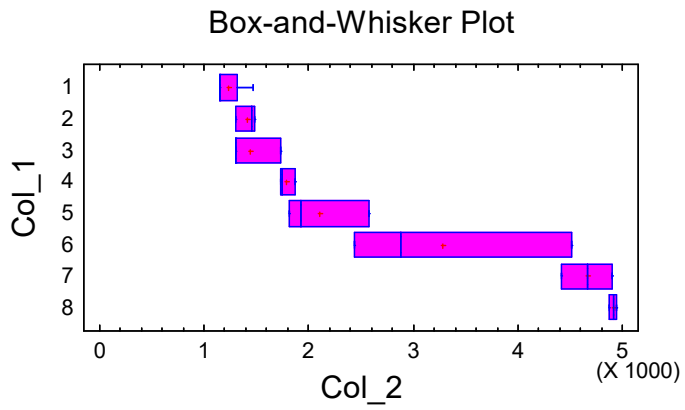
Method: 95.0 percent LSD

Col_1	Count	Mean	Homogeneous Groups
8	2	24.76	X
4	3	27.7167	XX
3	3	28.4367	XXX
7	3	30.7033	XXXX
1	4	33.26	XXX
2	3	34.64	XXX
6	3	35.4733	XX
5	3	36.98	X

Contrast	Difference	+/- Limits
1 - 2	-1.38	6.86514
1 - 3	4.82333	6.86514
1 - 4	5.54333	6.86514
1 - 5	-3.72	6.86514
1 - 6	-2.21333	6.86514
1 - 7	2.55667	6.86514
1 - 8	*8.5	7.78434
2 - 3	6.20333	7.33914
2 - 4	6.92333	7.33914
2 - 5	-2.34	7.33914
2 - 6	-0.833333	7.33914
2 - 7	3.93667	7.33914
2 - 8	*9.88	8.20541
3 - 4	0.72	7.33914
3 - 5	*-8.54333	7.33914
3 - 6	-7.03667	7.33914
3 - 7	-2.26667	7.33914
3 - 8	3.67667	8.20541
4 - 5	*-9.26333	7.33914
4 - 6	*-7.75667	7.33914
4 - 7	-2.98667	7.33914
4 - 8	2.95667	8.20541
5 - 6	1.50667	7.33914
5 - 7	6.27667	7.33914
5 - 8	*12.22	8.20541
6 - 7	4.77	7.33914
6 - 8	*10.7133	8.20541
7 - 8	5.94333	8.20541

* denotes a statistically significant difference.

3.1.2 Estadísticos para G´



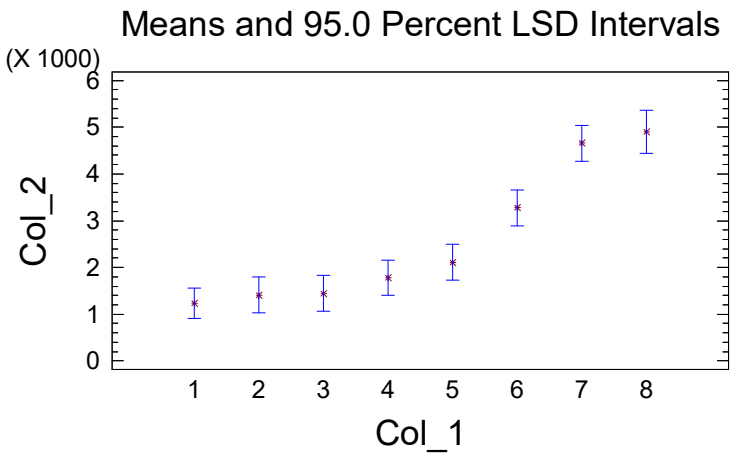
Multiple Range Tests for Col_2 by Col_1

Method: 95.0 percent LSD

Col_1	Count	Mean	Homogeneous Groups
1	4	1232.52	X
2	3	1412.13	XX
3	3	1446.19	XX
4	3	1782.72	XX
5	3	2110.56	X
6	3	3275.94	X
7	3	4658.92	X
8	2	4905.78	X

Contrast	Difference	+/- Limits
1 - 2	-179.608	710.694
1 - 3	-213.667	710.694
1 - 4	-550.201	710.694
1 - 5	*-878.041	710.694
1 - 6	*-2043.42	710.694
1 - 7	*-3426.4	710.694
1 - 8	*-3673.26	805.851
2 - 3	-34.06	759.764
2 - 4	-370.593	759.764
2 - 5	-698.433	759.764
2 - 6	*-1863.81	759.764
2 - 7	*-3246.79	759.764
2 - 8	*-3493.65	849.442
3 - 4	-336.533	759.764
3 - 5	-664.373	759.764
3 - 6	*-1829.75	759.764
3 - 7	*-3212.73	759.764
3 - 8	*-3459.6	849.442
4 - 5	-327.84	759.764
4 - 6	*-1493.22	759.764
4 - 7	*-2876.2	759.764
4 - 8	*-3123.06	849.442
5 - 6	*-1165.38	759.764
5 - 7	*-2548.36	759.764
5 - 8	*-2795.22	849.442
6 - 7	*-1382.98	759.764
6 - 8	*-1629.84	849.442
7 - 8	-246.865	849.442

* denotes a statistically significant difference.



Kruskal-Wallis Test for Col_2 by Col_1

Col_1	Sample Size	Average Rank
1	4	3.5
2	3	6.66667
3	3	7.33333
4	3	12.0
5	3	15.0
6	3	18.0
7	3	21.0
8	2	23.0

Test statistic = 21.0733 P-Value = 0.00366312

ANOVA Table for Col_2 by Col_1

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	4.26111E7	7	6.08731E6	31.59	0.0000
Within groups	3.08272E6	16	192670.0		
Total (Corr.)	4.56939E7	23			

3.1.3 Estadísticos para G´´

Multiple Range Tests for Col_2 by Col_1

Method: 95.0 percent LSD

Col_1	Count	Mean	Homogeneous Groups
8	2	613.22	X
4	3	816.25	XX
3	3	824.633	XXX
7	3	960.517	XXXX
1	4	1109.27	XXX
2	3	1205.85	XXX
6	3	1261.85	XX
5	3	1368.15	X

Contrast	Difference	+/- Limits
1 - 2	-96.5742	414.85
1 - 3	284.639	414.85
1 - 4	293.023	414.85
1 - 5	-258.877	414.85
1 - 6	-152.574	414.85
1 - 7	148.756	414.85
1 - 8	*496.053	470.396
2 - 3	381.213	443.493
2 - 4	389.597	443.493
2 - 5	-162.303	443.493
2 - 6	-56.0	443.493
2 - 7	245.33	443.493
2 - 8	*592.627	495.84
3 - 4	8.38333	443.493
3 - 5	*-543.517	443.493
3 - 6	-437.213	443.493
3 - 7	-135.883	443.493
3 - 8	211.413	495.84
4 - 5	*-551.9	443.493
4 - 6	*-445.597	443.493
4 - 7	-144.267	443.493
4 - 8	203.03	495.84
5 - 6	106.303	443.493

3.2 Estadística comportamiento reológico de geles de WPC

3.2.1 Estadísticos para G´ de WPC

ANOVA Table for Col_2 by Col_1

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	5.63689E7	7	8.0527E6	1567.38	0.0000
Within groups	82203.0	16	5137.69		
Total (Corr.)	5.64511E7	23			

Multiple Range Tests for Col_2 by Col_1

Method: 95.0 percent LSD

Col_1	Count	Mean	Homogeneous Groups
1	3	936.063	X
2	3	973.577	X
3	3	1157.23	X
4	3	1264.05	X
5	3	1667.69	X
6	3	2211.78	X
7	3	4658.11	X
8	3	4920.9	X

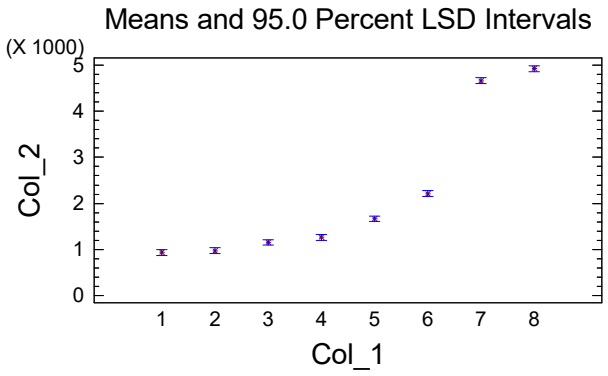
Contrast	Difference	+/- Limits
1 - 2	-37.5133	124.067
1 - 3	*-221.163	124.067
1 - 4	*-327.983	124.067
1 - 5	*-731.627	124.067
1 - 6	*-1275.72	124.067
1 - 7	*-3722.05	124.067
1 - 8	*-3984.83	124.067
2 - 3	*-183.65	124.067
2 - 4	*-290.47	124.067
2 - 5	*-694.113	124.067
2 - 6	*-1238.21	124.067
2 - 7	*-3684.54	124.067
2 - 8	*-3947.32	124.067
3 - 4	-106.82	124.067
3 - 5	*-510.463	124.067
3 - 6	*-1054.56	124.067
3 - 7	*-3500.89	124.067
3 - 8	*-3763.67	124.067
4 - 5	*-403.643	124.067
4 - 6	*-947.737	124.067
4 - 7	*-3394.07	124.067
4 - 8	*-3656.85	124.067
5 - 6	*-544.093	124.067
5 - 7	*-2990.42	124.067
5 - 8	*-3253.21	124.067
6 - 7	*-2446.33	124.067
6 - 8	*-2709.11	124.067
7 - 8	*-262.783	124.067

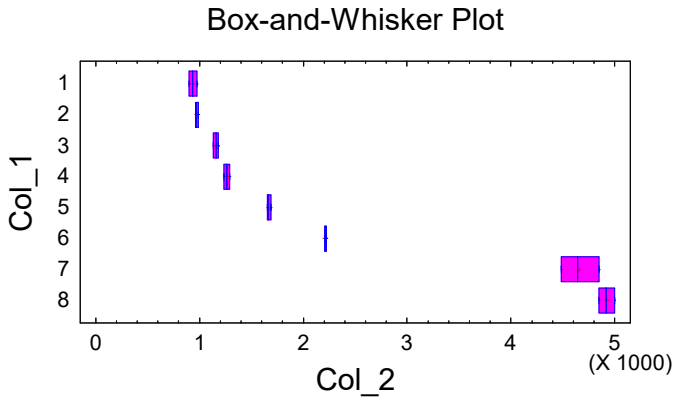
* denotes a statistically significant difference.

Kruskal-Wallis Test for Col_2 by Col_1

Col_1	Sample Size	Average Rank
1	3	2.66667
2	3	4.33333
3	3	8.0
4	3	11.0
5	3	14.0
6	3	17.0
7	3	20.0
8	3	23.0

Test statistic = 22.4933 P-Value = 0.00208756





3.2.2 Estadísticos para G´´

Kruskal-Wallis Test for Col_2 by Col_1

Col_1	Sample Size	Average Rank
1	3	17.6667
2	3	14.0
3	3	19.3333
4	3	3.66667
5	3	23.0
6	3	11.0
7	3	3.33333
8	3	8.0

Test statistic = 22.2267 P-Value = 0.00232158

ANOVA Table for Col_2 by Col_1

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	2.5552E6	7	365029.0	1319.36	0.0000
Within groups	4426.74	16	276.671		
Total (Corr.)	2.55963E6	23			

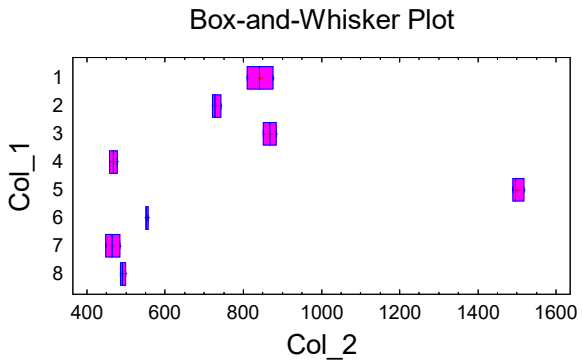
Multiple Range Tests for Col_2 by Col_1

Method: 95.0 percent LSD

Col_1	Count	Mean	Homogeneous Groups
7	3	465.81	X
4	3	467.697	X
8	3	492.09	X
6	3	552.947	X
2	3	730.183	X
1	3	842.457	X
3	3	867.923	X
5	3	1500.92	X

Contrast	Difference	+/- Limits
1 - 2	*112.273	28.7908
1 - 3	-25.4667	28.7908
1 - 4	*374.76	28.7908
1 - 5	*-658.463	28.7908
1 - 6	*289.51	28.7908
1 - 7	*376.647	28.7908
1 - 8	*350.367	28.7908
2 - 3	*-137.74	28.7908
2 - 4	*262.487	28.7908
2 - 5	*-770.737	28.7908
2 - 6	*177.237	28.7908
2 - 7	*264.373	28.7908
2 - 8	*238.093	28.7908
3 - 4	*400.227	28.7908
3 - 5	*-632.997	28.7908
3 - 6	*314.977	28.7908
3 - 7	*402.113	28.7908
3 - 8	*375.833	28.7908
4 - 5	*-1033.22	28.7908
4 - 6	*-85.25	28.7908
4 - 7	1.88667	28.7908
4 - 8	-24.3933	28.7908
5 - 6	*947.973	28.7908
5 - 7	*1035.11	28.7908
5 - 8	*1008.83	28.7908
6 - 7	*87.1367	28.7908
6 - 8	*60.8567	28.7908
7 - 8	-26.28	28.7908

* denotes a statistically significant difference.



3.2.3 Estadísticos para G*

ANOVA Table for Col_2 by Col_1

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	721.679	7	103.097	1102.59	0.0000
Within groups	1.49607	16	0.0935042		
Total (Corr.)	723.175	23			

Kruskal-Wallis Test for Col_2 by Col_1

Col_1	Sample Size	Average Rank
1	3	17.6667
2	3	14.0
3	3	19.3333
4	3	3.66667
5	3	23.0
6	3	11.0
7	3	3.5
8	3	7.83333

Test statistic = 22.1559 P-Value = 0.00238782

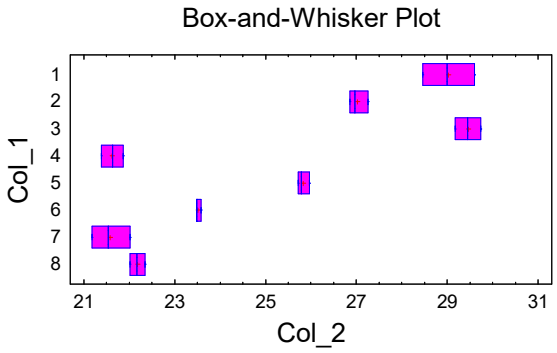
Multiple Range Tests for Col_2 by Col_1

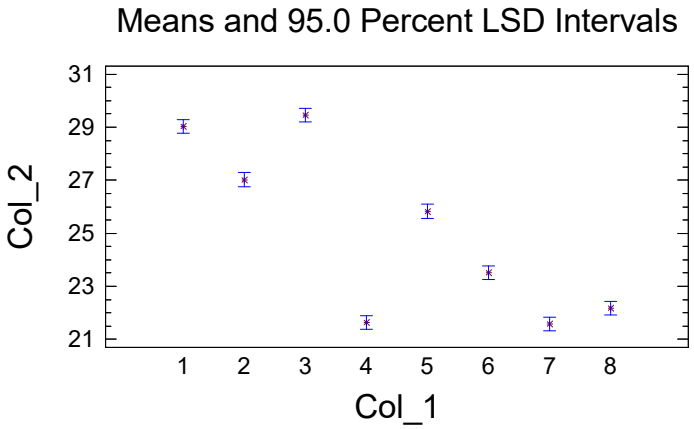
Method: 95.0 percent LSD

Col_1	Count	Mean	Homogeneous Groups
7	3	21.58	X
4	3	21.6267	X
8	3	22.18	X
6	3	23.5133	X
2	3	27.0233	X
1	3	29.02	X
3	3	29.4567	X
5	3	38.74	X

Contrast	Difference	+/- Limits
1 - 2	*1.99667	0.529282
1 - 3	-0.436667	0.529282
1 - 4	*7.39333	0.529282
1 - 5	*-9.72	0.529282
1 - 6	*5.50667	0.529282
1 - 7	*7.44	0.529282
1 - 8	*6.84	0.529282
2 - 3	*-2.43333	0.529282
2 - 4	*5.39667	0.529282
2 - 5	*-11.7167	0.529282
2 - 6	*3.51	0.529282
2 - 7	*5.44333	0.529282
2 - 8	*4.84333	0.529282
3 - 4	*7.83	0.529282
3 - 5	*-9.28333	0.529282
3 - 6	*5.94333	0.529282
3 - 7	*7.87667	0.529282
3 - 8	*7.27667	0.529282
4 - 5	*-17.1133	0.529282
4 - 6	*-1.88667	0.529282
4 - 7	0.0466667	0.529282
4 - 8	*-0.553333	0.529282
5 - 6	*15.2267	0.529282
5 - 7	*17.16	0.529282
5 - 8	*16.56	0.529282
6 - 7	*1.93333	0.529282
6 - 8	*1.33333	0.529282
7 - 8	*-0.6	0.529282

* denotes a statistically significant difference.


Box-and-Whisker Plot
Col_1
1
2
3
4
5
6
7
8
21
23
25
27
29
31
Col_2


Means and 95.0 Percent LSD Intervals
Col_2
31
29
27
25
23
21
1
2
3
4
5
6
7
8
Col_1