



Universidad del Azuay

Facultad de Ciencia y Tecnología

Escuela de Ingeniería en Alimentos

**Elaboración de un producto untable a base de extracto hidrosoluble
de soya mediante diseño experimental**

**Trabajo de graduación previo a la obtención del título de
Ingeniero en Alimentos**

Autor:

Luis Antonio Aguilar Tuárez

Director:

Ing. Cristian Rojas Villa

**Cuenca, Ecuador
2010**

DEDICATORIA

A mis padres Gustavo y María Narcisa, por ser mi ejemplo de lucha, honestidad y dedicación y por enseñarme que detrás del sacrificio está el camino del éxito.

A mis hermanos Gustavo, Cristian y Jorge, por ser mis fieles amigos y compañeros, mi gran motivación para luchar por esta meta.

A mi abuela Laura por su apoyo incondicional.

A una persona muy importante en mi vida, María Augusta, por brindarme todo su cariño y amor, en el largo transcurso de este sueño que ahora se cumple.

Gracias a todos ustedes.

Les llevo en el corazón.

Luis Antonio

AGRADECIMIENTO

Quiero agradecer a Dios, pues el es el autor de mi vida y el autor de este logro. A mis padres por ser mi ejemplo del camino a seguir y brindarme incondicionalmente su apoyo.

De manera muy sincera a mi director de tesis, Ingeniero Cristian Rojas, por su paciencia y dedicación en la realización de este trabajo.

Un especial agradecimiento al Doctor Piercosimo Tripaldi y a la Ingeniera María Fernanda Rosales por apoyarme en la realización de este trabajo.

A las autoridades de la Facultad de Ciencia y Tecnología, a todos mis distinguidos maestros quienes con sabiduría y entrega, supieron guiarme en la etapa universitaria.

Y a todas aquellas personas que de una u otra manera contribuyeron para la realización de este trabajo.

Luis Antonio

RESUMEN

En el presente trabajo se desarrolló la optimización de un producto untable a base de soya. Para el efecto se consideraron tres procesos: hidrólisis enzimática, gelificación y fermentación del extracto hidrosoluble. Los diferentes factores estudiados fueron optimizados por diseños de Box-Behnken. La importancia de los factores se evaluó mediante el análisis del Half- Normal Plot. Las variables representativas para la hidrólisis enzimática fueron: porcentaje de enzima y tiempo de hidrólisis. Para la gelificación la respuesta fue la cantidad de extracto seco. En la fermentación la respuesta constituyó la evaluación sensorial realizada por un panel, evidenciando las variables relevantes para el producto: inóculo y tiempo de fermentación.

ABSTRACT

In this present work, the optimization of a soy-based spread was developed. Three processes were considered: enzymatic hydrolysis, gel transformation and fermentation of hydrolytic extract. The factors studied were optimized by Box-Behnken designs. The importance of the factors was evaluated analyzing the Half-Normal Plot. The main variables for enzymatic hydrolysis were: enzyme percentage and hydrolysis time. For gel transformation the response was the quantity of dry extract. For the fermentation the response was obtained from the sensorial evaluation performed by a panel. As a result, the main variables identified were: inoculum and fermentation time.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Dedicatoria.....	ii
Agradecimiento.....	iii
Resumen.....	iv
Abstract.....	v
Indice de Contenidos.....	vi
Indice de Ilustraciones.....	xii
Indice de Tablas.....	xiv
Indice de Anexos.....	xvii

INTRODUCCIÓN.....	1
-------------------	---

CAPÍTULO 1: GENERALIDADES DE LA SOYA

1.1. Descripción y Antecedentes.....	3
1.1.1. Introducción.....	3
1.1.2. Estructura y Componentes del Grano de Soya.....	3
1.1.3. Calidad nutricional de los granos de Soya.....	6
1.1.4. Procesamiento.....	8
1.2. Beneficios de la Soya.....	9
1.2.1. Componentes Bioactivos de los Granos de Soya.....	9
1.2.1.1. Isoflavonas.....	10
1.2.1.3. Lipoxigenasas.....	11
1.3. Propiedades funcionales de la Soya.....	12
1.4. Conclusiones.....	13

CAPITULO 2: PROTEÍNA DE SOYA

2.1. Desarrollo de la química de las proteínas.....	14
2.1.1. Composición de aminoácidos.....	14
2.1.2. Estructura organizacional.....	14
2.1.2.1. Estructura primaria de las proteínas.....	15
2.1.2.2. Estructura secundaria.....	16
2.1.2.3. Estructura terciaria.....	17

2.1.2.4. Estructura cuaternaria.....	17
2.2. Modificación de proteínas para optimizar la funcionalidad.....	17
2.2.1. Introducción a la hidrólisis enzimática.....	17
2.2.2. Hidrólisis de las proteínas.....	19
2.2.2.1. La hidrólisis ácida.....	19
2.2.2.2. La hidrólisis alcalina.....	19
2.2.2.3. La hidrólisis enzimática.....	20
2.2.1.3.4. Producción enzimática de proteínas hidrolizadas.....	20
2.3. Materias primas de la proteína.....	22
2.3.1. Condiciones de la reacción.....	23
2.4. Control del proceso de hidrólisis.....	24
2.4.1. pH stat.....	24
2.4.2. Osmometría.....	24
2.4.3. Determinación de la cantidad de nitrógeno amino.....	25
2.5. Aplicaciones.....	26
2.5.1. Propiedades nutricionales.....	27
2.5.1.1. Valor nutricional.....	27
2.5.1.2. Reducción de la alergenicidad.....	28
2.5.2. Propiedades funcionales.....	29
2.5.2.1. Propiedades de Superficie.....	29
2.5.2.2. Gelificación y agregación de agua.....	30
2.5.2.3. Solubilidad.....	30
2.5.3. Propiedades organolépticas.....	30
2.6. Conclusiones.....	31

CAPITULO 3: GELIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA DE SOYA

3.1. Introducción.....	32
3.2. Gelificación de la Proteína de soya.....	34
3.2.1. Coagulantes involucrados en el proceso de gelificación de la leche de soya.....	34
3.2.1.1. Por el tipo de gelificación.....	35
3.2.1.1.1. Gelificación ácida.....	35
3.2.1.1.2. Gelificación iónica.....	35
3.2.1.2. Por la velocidad de gelificación podemos.....	35

3.2.1.2.1. Coagulantes de actividad lenta.....	35
3.2.1.2.1. Coagulantes de actividad rápida.....	35
3.2.2. Coagulación con sales de iones.....	35
3.2.3. Coagulación ácida.....	35
3.3. Toxicidad de los coagulantes más importantes.....	37
3.3.1. Cloruro de Calcio.....	37
3.3.1.1. Metabolismo, biotransformación y cinética.....	38
3.3.1.1.1. Calcio.....	38
3.3.1.1.2. Cloruro.....	38
3.3.1.2. Mecanismo de acción.....	38
3.3.1.2.1. Calcio.....	38
3.3.1.2.1. Cloruro.....	39
3.3.1.2. Toxicidad.....	39
3.3.2. Cloruro de Magnesio.....	39
3.3.3. Glucono Delta Lactona.....	40
3.3.3.1. Metabolismo, biotransformación y cinética.....	41
3.3.3.2. Toxicidad.....	41
3.4. Conclusiones.....	41

CAPITULO 4: CULTIVOS LÁCTICOS APLICABLES EN SOYA

4.1. Biosíntesis y papel fisiológico de los oligosacáridos de la rafinosa, principales azúcares de la soya.....	42
4.2. Oligosacáridos de rafinosa y disturbios intestinales.....	43
4.3. Las bifidobacterias.....	45
4.3.1. Descubrimiento e historia.....	45
4.3.2. Morfología.....	46
4.3.3. Fisiología.....	47
4.3.3.1. Tipo de respiración.....	47
4.3.3.2. Temperatura y ph.....	47
4.3.4. Metabolismo.....	47
4.3.4.1. Metabolismo del azúcar.....	47
4.3.4.1.1. Metabolitos.....	47
4.3.4.1.2. Las enzimas.....	48
4.4. El genero lactococcus.....	50

4.4.1. Introducción.....	50
4.4.2. Taxonomía.....	50
4.4.3. Hábitat.....	51
4.5. El genero leuconostoc.....	52
4.5.1. Introducción.....	52
4.5.2. Habitats.....	52
4.5.3. El género en otros hábitos alimenticios.....	53
4.5.5. Fermentación de carbohidratos.....	53
4.5.4. Condiciones generales de crecimiento.....	53
4.6. Conclusiones.....	53

CAPITULO 5: DISEÑO EXPERIMENTAL

5.1 Introducción.....	54
5.2. Generalidades del diseño experimental.....	55
5.3. Objetivos del diseño experimental.....	56
5.4. Ventajas del diseño experimental.....	57
5.5. Etapas de un diseño experimental.....	57
5.5.1. Análisis del problema.....	58
5.5.2. Planificación de los experimentos.....	59
5.5.3. Ejecución de los experimentos.....	60
5.5.4. Tratamiento estadístico de los datos y análisis de resultados.....	61
5.6. Escalado de las variables.....	61
5.7. Diseño factorial a dos niveles y “k” factores.....	62
5.7.1. Descripción.....	64
5.8. Cálculo del modelo de regresión.....	66
5.9. Determinación de los efectos significativos.....	67
5.9.1. Error experimental.....	68
5.9.2. Probability plots normal	70
5.10. Optimización.....	73
5.10.1. Box-Behnken.....	73
5.10.2. Simplex.....	76
5.10.2.1. Cálculo del escenario experimental para un nuevo experimento en el simplex.....	78
5.10.3. Método de superficie de respuesta.....	79

5.10.4. Método de la máxima pendiente.....	84
5.11. Evaluación sensorial.....	85
5.12. Funciones de utilidad.....	85
5.13. Conclusiones.....	86

CAPÍTULO 6: DESARROLLO EXPERIMENTAL

6.2. Materiales y Métodos.....	88
6.2.1. Materiales.....	88
6.2.2. Métodos experimentales.....	88
6.2.2.1. Proceso de hidrólisis.....	89
6.2.2.2. Proceso de gelificación.....	89
6.2.2.3. Proceso de fermentación.....	90
6.2.3. Aplicación de Métodos experimentales.....	91
6.2.3.1. Proceso de hidrólisis.....	92
6.2.3.1.1 Introducción.....	93
6.2.3.1.2 Variables de estudio.....	94
6.2.3.1.3 Matriz del modelo experimental.....	94
6.2.3.1.4 Coeficientes del modelo.....	95
6.2.3.1.5 Ponderación de variables.....	95
6.2.3.1.6 Aplicación de Superficie de respuesta.....	96
6.2.3.1.7 Optimización por método simplex.....	95
6.2.3.2. Proceso de Gelificación.....	97
6.2.3.2.1. Introducción.....	97
6.2.3.2.2. Variables experimentales.....	99
6.2.3.2.3. Matriz del diseño experimental.....	99
6.2.3.2.4 Coeficientes de las variables de screening.....	100
6.2.3.2.5 Optimización por el método de máxima pendiente.....	101
6.2.3.3. Proceso de fermentación.....	102
6.2.3.3.1 Variables del proceso.....	103
6.2.3.3.2 Evaluación Sensorial.....	104
6.2.3.3.3 Funciones de utilidad de los parámetros sensoriales.....	105
6.2.3.3.4 Matriz del diseño experimental screening.....	106
6.2.3.3.5 Coeficientes de las variables de screening.....	107

6.2.3.3.6 Ponderación de variables.....	108
6.2.3.3.7 Matriz del diseño experimental superficie de respuesta.....	109
6.2.3.3.8 NUEVOS Coeficientes de las variables.....	110
6.2.3.3.9. Optimización por el método de superficie de respuesta.....	111
CONCLUSIONES.....	112
BIBLIOGRAFÍA.....	113
ANEXOS.....	117

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

FIGURAS

Figura 1. Granos de Soya	3
Figura 2. Estructura del grano de soya	5
Figura 3: El enlace peptídico	14
Figura 4: Esquema relaciones estructura-función en los alimentos.....	17
Figura 5: Visión esquemática de la los procesos de hidrólisis enzimática.....	20
Figura 6: Función hidrólisis.....	25
Figura 7: Reacción de hidrólisis en solución de la glucono-delta-lactona a ácido glucónico.....	40
Figura 8: Síntesis de los oligosacáridos de la soya.....	42
Figura 9: Hidrólisis de los oligosacáridos.....	44
Figura 10: Actividad α -galactosidasa.....	48
Figura 11: Tronco de separación de la familia Lactococcus.	50
Figura 12. Factores, experimentos y respuesta experimental.....	57
Figura 13. Ciclo de resolución de un diseño experimental.....	57
Figura 14. Número de experimentos para n niveles y k factores.....	59
Figura 15. Experimentos para un diseño factorial a dos niveles y k factores.....	63
Figura 16. Representación de un diseño factorial completo a dos niveles y tres factores.....	64
Figura 17. Normal Probability Plots.....	71
Figura 18. Half Normal Probability Plots.....	71
Figura 19. Presentación del Diseño de Box Behnken para tres factores.....	74
Figura 20. Presentación del Diseño de Box Behnken para tres factores.....	74
Figura 21. Simplex de dos variables.	76
Figura 22. Ilustración de una optimización simplex con dos variables.....	76
Figura 23. Proyección de la esquina S, con pobre resultado, a la nueva esquina T en el Simplex.....	78
Figura 24. Esquema de un diseño central compuesto a 2 niveles y 2 variables....	78
Figura 25. Modelo de superficie de respuesta cuadrático.....	79

Figura 26. Diagrama de Flujo proceso de hidrólisis enzimática.....	90
Figura 27. Half-Normal Plot de los coeficientes de regresión proceso de hidrólisis enzimática.....	92
Figura 28. Superficie de respuesta.....	93
Figura 29. Aplicación del método simplex.....	94
Figura 30. Diagrama de Flujo proceso de gelificación.....	96
Figura 31 Diagrama de flujo del proceso de fermentación.....	99
Figura 32. Funciones de utilidad.....	100
Figura 33. Superficie de respuesta proceso de fermentación.....	104

FOTOGRAFÍAS

Fotografía 1. Cryostar I de FUNKE GERBER.....	91
Figura 2. a). Calentamiento extracto hidrosoluble de soya.	97
Figura 2. b). Gelificación	98

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Composición centesimal del grano entero de soya.....	5
Tabla 2: Patrones de aminoácidos de referencia.....	7
Tabla 3: Enzimas endopeptidasas con relevancia industrial	22
Tabla 4: Diferentes compuestos utilizados para la gelificación de la proteína de soya.....	36
Tabla 5. Número de experimentos para n niveles y k factores.....	60
Tabla 6. Matriz del diseño a dos niveles para 1, 2, 3 y 4 variables.....	63
Tabla 7. Matriz del diseño para dos niveles y 3 factores	65
Tabla 8. Matriz del modelo para dos niveles y 3 factores.....	66
Tabla 9. Diseño de Box-Behnken para $k= 3,4$ y 5 factores	74
Tabla 10. Matriz del modelo para un diseño central compuesto a 2 niveles y 2 variables.....	80
Tabla 11. Variables y condiciones experimentales de screening proceso de hidrólisis.....	92
Tabla 12. Matriz del modelo factorial incompleto etapa de hidrólisis.....	92
Tabla 13. Coeficientes de las variables de screening etapa de hidrólisis.....	93
Tabla 14. Variables y condiciones experimentales etapa de gelificación.....	98
Tabla 15. Matriz del modelo factorial incompleto etapa de gelificación.....	98
Tabla 16. Coeficientes de las variables de screening etapa de gelificación.....	99
Tabla 17. Error expandido de los coeficientes de regresión.....	99
Tabla 18. Valores experimentales para el diseño de máxima pendiente.....	100
Tabla 19. Variables y condiciones experimentales etapa de fermentación.....	101
Tabla 20. Matriz del modelo factorial incompleto etapa de fermentación.....	103
Tabla 21. Coeficientes de las variables etapa de fermentación.....	103
Tabla 22. Parámetros para el cálculo del error expandido.....	104
Tabla 23. Matriz del modelo de superficie de respuesta.....	105
Tabla 24. Coeficientes del modelo de superficie de respuesta.....	105

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Ficha de Catación.....	117
Anexo 2. Ficha de información cultivo CHN 11.....	119
Anexo 3. Ficha de seguridad cultivo CHN 11.....	121

Aguilar Tuárez, Luis Antonio
Trabajo de Graduación
Ing. Cristian Rojas Villa
Diciembre 2010

Elaboración de un producto untable a base de extracto hidrosoluble de soya mediante diseño experimental

INTRODUCCIÓN

La soya representa una excelente fuente de proteína de alta calidad con un bajo contenido de grasa saturadas y gran proporción de fibra. El uso de la soya en alimentos funcionales es muy interesante, el consumo de la proteína y fibra de soya reduce el riesgo de enfermedades cardiovasculares y puede ayudar en el control glicémico. Además las isoflavonas de soya están asociadas en el tratamiento de diferentes enfermedades. Por lo tanto la soya puede jugar un importante rol en la promoción de la salud.

Los spreads se adaptan a los hábitos de consumo de la población, ya que se untan por lo general en pan, galletas; pudiendo tomar una mayor relevancia según su calidad funcional. En la actualidad mercados como el Mexicano y Brasileiro han desarrollado spreads a base de soya con gran aceptabilidad por el consumidor. Los spreads pueden ser obtenidos sometiendo a la proteína nativa a un tratamiento previo a la gelificación, el cual puede consistir en una hidrólisis. Para la hidrólisis se pueden utilizar enzimas de alto grado de especificidad como la papaína o bromelina. Cuando se realiza este tratamiento sobre el extracto hidrosoluble de soya, debe conservarse su identidad para que pueda producirse posteriormente la gelificación de la proteína nativa.

Para producir la precipitación de las proteínas de soya se suelen emplear sales como el Cloruro de Calcio y el Sulfato de Magnesio. La coagulación por el uso de sales ocurre por la disminución de las cargas negativas de la proteína como resultado de la unión de iones positivos con aminoácidos cargados negativamente en las moléculas de la proteína. La soya es rica α -galactósidos que ocasionan problemas en la

digestión del consumidor por lo que el extracto hidrosoluble debe ser fermentado; obteniéndose a su vez beneficios como son cambio en la acidez del producto final y el aumento de aromas.

Las metodologías experimentales consisten en establecer la relación existente entre las variables de estudio y la respuesta experimental. Al analizar todas las posibles combinaciones entre los niveles alto y bajo de cada factor y sus respectivas interacciones con las otras variables en estudio se realiza un screening. Este permite estimar cual es el cambio en la respuesta al variar los factores y también la influencia debida a las combinaciones lineales de los mismos.

Frecuentemente en el área de los alimentos se tienen que optimizar respuestas que dependen de varias percepciones; por ejemplo, ensayos organolépticos. La importancia del análisis sensorial de los alimentos se define en un sentido amplio como el conjunto de técnicas de medida y evaluación de determinadas propiedades de los alimentos. Normalmente la mayoría de selecciones se basan sobre una serie de preferencias definidas en función de otros criterios. Las funciones multicriterio, tipo función de utilidad, son un instrumento fundamental que permite tener una estrategia matemática para estudiar las diferentes sensaciones gustativas de las muestras en una sola respuesta que representa el resultado total del experimento.

Bajo este concepto, el trabajo realizado presenta una aplicación de diversas metodologías de diseño experimental para estudiar y optimizar tres procesos en la elaboración de la crema de soya.

CAPITULO 1

GENERALIDADES DE LA SOYA

1.1. Descripción y Antecedentes

1.1.1. Introducción

“La soya (*Glycine max*) pertenece a las leguminosas y por su elevado contenido de aceite se incluye, junto con el cártamo, el algodón, el girasol, la aceituna y el cacahuate, dentro de las oleaginosas” (BADUI, 1999, 554...). En muchos países occidentales, esta semilla se utiliza para la extracción de aceite y el residuo o pasta, rico en proteína, se emplea para la alimentación animal; por otra parte en el Oriente, la soya es fundamental en la dieta de un gran sector de la población. Debido a sus propiedades nutritivas, principalmente por su proteína, y en los últimos años ha habido un gran desarrollo científico y tecnológico para su aprovechamiento integral.



Figura 1. Granos de Soya

Fuente: ZAIGUI, Li; HONGZHUO, Tan. 2009. Traditional Chinese foods: production and research progress. Nova Science Publishers, Inc. 353 páginas. United States.

Puede ser preparada tanto como poroto, germinada (brotes) y en una variedad increíble de subproductos: leche de soya, queso de soya, salsa de soya y lecitina de soya. El queso de soya, llamado tofu es un alimento muy liviano y recomendable. A partir de la mita del siglo XX tuvieron inicio las primeras observaciones de la baja

incidencia de cáncer de mamá y próstata en poblaciones del sudeste asiático, comparándola con la población norteamericana, también se observó a los emigrantes asiáticos en los Estados Unidos. Investigaciones apuntaron al cambio en el patrón alimentario como el principal factor, y el consumo de soya y sus productos como la diferencia más dramática. (MATEOS-APARICIO ,et al, 2008)

Desde entonces están siendo desarrolladas intensivas investigaciones por todo el mundo, buscando los compuestos activos responsables en la protección contra el cáncer y también contra otras dolencias crónico degenerativas, entre las cuales están la hipercolesterolemia y aterosclerosis; actualmente los compuestos considerados los principales responsables de los efectos benéficos de la soya son las isoflavonas, la proteína de soya y los ácidos grasos esenciales.

Existen autores que están empezando a relacionar la proteína de soya con una disminución del riesgo de dolencias cardiovasculares, a pesar de que las investigaciones no son concluyentes. Encontraron que alimentando a ratones diabéticos con hidrolizados proteicos de soya hubo una menor absorción de grasa y mayor utilización pos-prandial de carbohidratos. (PALOU, et al, 2007)

La utilización de la soya en la alimentación humana ha sido posible debido al uso de procesos tecnológicos, resultando en productos como la leche de soya, yogures, margarinas, harina desengrasada, proteínas texturizadas ampliamente usadas en productos cárnicos, productos fermentados (miso, natto, tempeh) y no fermentados (tofu).

1.1.2. Estructura y Componentes del Grano de Soya

“En forma general, la soya está anatómicamente constituida por tres fracciones principales: la cascarilla, que representa 8% del peso total de la semilla, el hipocotíleo (2%) y el cotiledón (90%); en este último, se localiza el aceite en unos pequeños compartimentos, llamados esferosomas, de 0,2 a 0,3 μm y que a su vez están dispersos entre los cuerpos proteínicos denominados aleuronas de mayor tamaño (2 a 20 μm) integrados por aproximadamente 98% de proteínas y algo de lípidos y de ácido fítico” (BADUI, 1999, 554...).

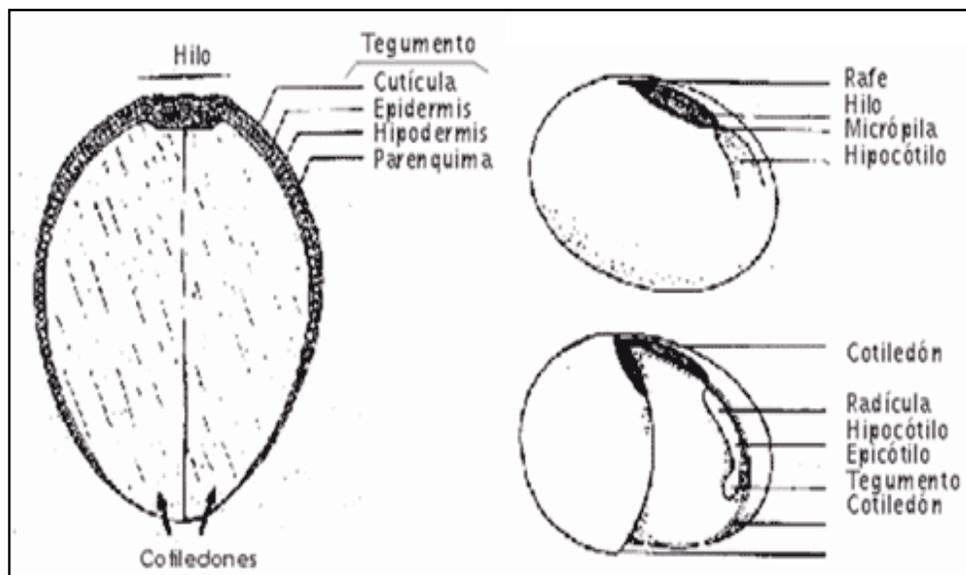


Figura 2. Estructura del grano de soja

Fuente: RIDNER, Egardo. 2006. Soja, propiedades nutricionales y su impacto en la salud. 1era Edición. Editorial Grupo Q S.A. 96 páginas. Argentina.

La composición centesimal del grano de soja se presenta en la siguiente tabla:

Tabla 1: Composición centesimal del grano entero de soja.

COMPOSICIÓN (g por 100 gramos de soja)	
Proteínas	40,5
Lípidos Totales	22,1
Carbohidratos totales	10,1
Fibra alimentaria total	21,7
Cenizas	5,6

La fracción lipídica está integrada por triacilglicéridos que contienen 14% de ácidos grasos saturados, 22% de ácido oleico, 55% de ácido linoléico y 8% de ácido linolénico, con un punto de solidificación aproximado de -16 °C y un índice de yodo de 130. También se encuentran fosfolípidos, esteroides y tocoferoles; cabe indicar que de la refinación del aceite se obtiene la lecitina, ampliamente utilizada por sus propiedades funcionales. La acumulación de lípidos en las oleaginosas va acompañada de un decremento de los hidratos de carbono, que significa que es muy probable que éstos sean los precursores en la síntesis de grasas.

Por su parte los hidratos de carbono están compuestos por:

a) polisacáridos insolubles en agua y en etanol, tales como arabinogalactanas, arabinanas, xilanas, galactomananas, celulosa y un polímero ácido muy parecido a las sustancias pécticas que representa aproximadamente 50% de los hidratos de carbono totales;

b) oligosacáridos hidrosolubles, tales como verbascosa (en muy baja concentración), estaquiosa 3,8%, rafinosa 1,1% y sacarosa 4,5%, que son los responsables de la flatulencia que provoca el consumo de oleaginosas.

c) monosacáridos en menor cantidad, principalmente glucosa y arabinosa.

Al igual que sucede con otros tejidos vegetales, la soya contiene en su estado natural diversos factores antifisiológicos, como son los inhibidores de tripsina

1.1.3 Calidad nutricional de los granos de soya

La soya constituye una excelente fuente de proteína para la alimentación humana y animal, pues además de contener cerca del 40% de proteína en sus granos, estas son de elevado poder nutritivo. “La composición de aminoácidos indispensables, cuando es comparada con la tabla de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación” (FAO/OMS, 1985) conforme a la Tabla 2, indica que, con excepción de los aminoácidos sulfurados, la proteína de soya presenta porcentajes de aminoácidos debidamente balanceados.

Tabla 2: Patrones de aminoácidos de referencia

Patrones de aminoácidos de referencia, composición de aminoácidos de la proteína de soya (mg/g) y score químico.			
Aminoácidos	FAO/OMS (1985) 2-5 años (mg/g proteína) A	Soya (mg/g) B	Score Químico B/A
Isoleucina	28	46	1,64
Leucina	66	78	1,18
Lisina	58	64	1,10
Metionina + Cisteína	25	26	1,94
Fenilalanina + Tirosina	63	88	1,40
Treonina	34	39	1,15
Triptofano	11	14	1,27
Valina	35	46	1,31
Histidina	19	26	1,37

Los aminoácidos metionina y cisteína son limitantes en la soya así como en todas las leguminosas. Más, la proteína de soya es rica en lisina, y este aminoácido es limitado en los cereales, los cuales son ricos en aminoácidos sulfurados, lo que la torna a la soya en una fuente ideal para complementar a los cereales.

Para la población del futuro, la soya puede ser considerada entre los principales alimentos, por sus cualidades nutricionales, su facilidad de cultivo, adaptación a casi todas las regiones de cultivo y su alta producción.

1.1.4. Procesamiento

Los antiguos chinos aprendieron que la soya puede ser remojada en agua y calentada para elaborar productos más interesantes y útiles a partir de sus constituyentes. La leche de soya y el tofu son dos productos elaborados a partir de la soya que han sido consumidos en Asia desde el año 200 AC. Los procedimientos fueron desarrollados por prueba y error sin el conocimiento de las razones físicas y químicas de los distintos pasos. Los procesos para elaborar leche de soya y tofu fueron probados para refinar los ingredientes en bruto por extracción de las fracciones deseadas de grasa y proteína a partir del grano de soya. (CIABOTTI, 2010)

La soya es remojada en agua por varias horas hasta que se ablanda. La molienda, en exceso de agua, es necesaria para aumentar el área superficial y reducir las dimensiones para permitir las operaciones de transferencia de materia y calor en los siguientes pasos. Calentar el grano remojado y molido es útil para varios propósitos. Los sabores y olores volátiles son eliminados. El calentamiento también inactiva los inhibidores de proteínasa (inhibidores de tripsina) y destruye la hemaglutinina (proteína de la planta que aglutina la sangre). La filtración remueve los carbohidratos insolubles y las cascarillas de la emulsión proteína-aceite. El filtrado es extracto hidrosoluble de soya, que tiene una apariencia y contenido de proteínas similar a la leche de vaca.

Como todos los productos basados en soya, el perfil de aminoácidos es deficiente en metionina. A diferencia de la leche de vaca no contiene lactosa. El PER (protein efficiency ratio) del extracto hidrosoluble es 2, mientras que el de la leche de vaca es 2,5. El extracto hidrosoluble de soya puede ser consumido directamente o puede ser

transformado en tofu. Para lograr esto, se agregan sales de gelificación. Los iones presentes en las sales sean calcio o magnesio causan el agregado de la proteína a través de puentes de calcio o magnesio y su posterior precipitación. El aceite, que forma parte de la emulsión con la proteína, también precipita por lo que se lo considera parte de la matriz alimentaria del producto formado. La cuajada resultante tiene una estructura tipo gel. Durante este proceso de coagulación ocurre un refinamiento (purificación) del extracto hidrosoluble de soya. El suero, que se expulsa, contiene carbohidratos solubles tales como sacarosa, estaquiosa y rafinosa. Adicionalmente, la hemaglutinina tiende a ser soluble en el suero. El suero puede ser removido fácilmente por decantación. (COCIO, 2010)

En el proceso de coagulación hay fraccionamiento de la proteína. Una cierta fracción de proteína es soluble en el suero. Esto altera negativamente el balance de aminoácidos desde que el PER del tofu es 1,8 comparado al extracto hidrosoluble de soya que es 2. La remoción de estaquiosa y rafinosa es importante pues pueden causar molestia gastrointestinal y flatulencia debido a que no son hidrolizadas con facilidad en el proceso digestivo sino que fermentan en el intestino grueso. El tofu recibe cada vez más atención en Occidente mientras el costo de las fuentes proteicas tradicionales continúan aumentando y la gente se involucra cada vez más con la relación alimento / salud.

1.2. Beneficios de la Soya

La información y divulgación acerca de los beneficios de los compuestos bioactivos presentes en la soya como las isoflavonas ha generado un aumento en la demanda por los productos hechos a base de esta leguminosa, y su uso en la alimentación humana esta siendo cada vez más recomendado por los médicos.

“La FDA-EUA determinó que el consumo diario de 25 gr de proteína de soya, lo que corresponde a 60 gr de granos aproximadamente, como parte de una dieta baja en ingestión de colesterol y ácidos grasos insaturados, coadyuva para el control de los niveles de colesterol y triglicéridos, reduciendo, así, los riesgos de dolencias cardíacas” (RIDNER, 20006).

1.2.1 Componentes bioactivos del grano de soya

1.2.1.1. Isoflavonas

Las isoflavonas son flavonoides encontrados casi exclusivamente en las leguminosas y fabáceas. En la soya las principales son la genisteína, diadzeína e gliciteína. Su estructura es similar a la del estrógeno, siendo capaz de ligarse a los receptores de esa hormona ejerciendo un efecto de modulador selectivo: en algunos tejidos desencadena efecto estrogénico, en cuanto que en otros desencadena un efecto anti-estrogénico. La genisteína tiene un efecto reconocido en la inhibición de la enzima tirosina quinasa, relacionada al desarrollo exacerbado de células cancerosas.

En ratas, científicos concluyeron que una exposición a la genisteína confirió protección contra el cáncer de mama químicamente inducido. La genisteína también ha sido relacionada con el aumento de la densidad ósea de mujeres en la posmenopausia y con una reducción de la oxidación del LDL, implicado en la reducción de las dolencias cardiovasculares. (PALOU, et al, 2007)

1.2.1.2. Inhibidores de la Tripsina

Los inhibidores de la tripsina son sustancias naturalmente presentes en los granos de soya y son capaces de interferir en la actividad proteolítica de la tripsina en el tracto gastrointestinal de hombres y animales. Están ampliamente distribuidas en los vegetales, particularmente entre las leguminosas, representando cerca del 0,2 a 0,3% del contenido total de las proteínas de los granos de soya. Las funciones fisiológicas atribuidas a los inhibidores en el vegetal incluyen la manutención del ciclo de vida del grano, control de proteínas endógenas y prevención del ataque de microorganismos e insectos depredadores.

Los inhibidores de la tripsina de la soya están agrupados en dos familias: la del inhibidor Kunitz y la del inhibidor Bowman-Birk. El primero presenta un peso molecular de aproximadamente 24 kDa, contiene residuos de aminoácidos, y dos puentes disulfuro por molécula. Es termolábil, contiene altos porcentajes de glicina y posee acción solamente sobre la tripsina. El inhibidor de Bowman-Birk es una proteína con peso molecular de 8 kDa y contiene siete puentes disulfuro por

molécula, las cuales estabilizan la composición molecular necesaria para la actividad biológica. Presentan gran estabilidad al calor, a los ácidos y a álcalis. Contiene altos porcentajes de serina y presenta capacidad para inhibir la tripsina y la quimotripsina en sitios de ligaciones independientes.

El efecto atribuido a la acción de los inhibidores de la proteasa de soya es la inhibición del crecimiento y alteraciones metabólicas del páncreas, con aumento de la secreción enzimática, hipertrofia e hiperplasia. La inhibición de la protéolisis intestinal resulta en un aumento de secreción de las enzimas digestivas las cuales son eliminadas en las heces, representando una pérdida endógena importante de aminoácidos azufrados. Esta pérdida endógena no puede ser compensada por la ingestión de la proteína de la leguminosa, aumentando así el impacto nutricional de los inhibidores en la alimentación de animales monogástricos. En general, los productos comerciales de soya reciben tratamiento térmico de forma que presentan menos de 20% de actividad inhibitoria de tripsina de soya cruda. (LEMOS, 2010)

1.2.1.3. Lipoxigenasa

La presencia de la enzima lipoxigenasa en los productos a base de soya puede acentuar la inestabilidad de los mismos, resultando en aromas y sabores indeseables debido a la hiperoxidación de los ácidos grasos y por la interacción con proteínas.

Los compuestos volátiles formados son los responsables por el sabor herbáceo o de fréjol crudo, de tinta o de rancio que también afectan el color y el valor nutritivo por la disminución de ácidos grasos esenciales y del porcentaje de vitaminas. Los compuestos volátiles son responsables por el sabor amargo y astringente, los cuales son formados por deterioración oxidativa de aminoácido y por la hidrólisis enzimática.

En la soya, con bajo contenido de humedad y sin daños físicos, no existe sabor desagradable, una vez que la enzima y el substrato están en compartimientos separados dentro del vegetal. No en tanto, cuando los granos de soya son dañados en presencia de humedad, la lipoxigenasa empieza a actuar catalizando una oxidación

de los ácidos grasos insaturados, promoviendo el desarrollo de sabores desagradables.

La lipoxigenasa es una dioxigenasa que contiene un ión hierro en su centro activo, capaz de catalizar la reacción inicial de hidroperoxidación de los ácidos grasos poliinsaturados, que contienen grupos cis-cis 1,4 pentadieno. Los ácidos linoleico y linolénico poseen esta estructura y están presentes en la soya. (RODRIGUEZ, 2007)

1.3. Propiedades funcionales de la soya

Entre los alimentos de origen vegetal la soya se destaca, no solo por la cantidad, más también por la calidad de proteínas, por la presencia de lípidos, vitaminas, minerales, así como por la presencia de algunos metabolitos secundarios, clasificándola como alimento funcional. Es versátil como alimento debido a sus adecuadas propiedades funcionales, lo que la predispone a ser parte de un sinnúmero de sistemas alimenticios.

La absorción y la retención de agua por los alimentos proteicos tienen un papel fundamental en la calidad de textura de la matriz alimentaria. La absorción de agua en una disolución de las proteínas conduce a una expansión y confiere propiedades, tales como consistencia, espesamiento, viscosidad y adherencia.

Algunas superficies polares, tales como los grupo amino y carboxilo, son ionizables y de igual forma, la polaridad puede ser alterada conforme la variación del pH

Así el uso de la soya en la industria está aumentando en razón de sus propiedades funcionales, las cuales se están tornando más importantes que su contribución nutritiva. Muchos científicos definen esas propiedades funcionales como:

Solubilidad: que es influenciada por la mayor o menor afinidad de las moléculas de la proteína por solvente el que, en el caso de los alimentos, es el agua. Por eso, la solubilidad es clasificada como una propiedad hidrofílica.

Emulsionante: que disminuye la tensión superficial existente entre dos fases y permite la formación de emulsión (mezcla de dos líquidos inmiscibles). Además la acción estabilizante de la emulsión que es la capacidad que tiene una solución de proteína o una suspensión de alimento proteico de formar una mezcla homogénea y estable como aceite o grasa líquida.

Gelificación: que es la capacidad de las macromoléculas en suspensión acuosa de formar coloides de mayor o menor fluidez, dependiendo de la concentración de las macromoléculas, bien como de su naturaleza.

Las proteínas de soya contienen numerosas cadenas laterales polares, haciendo que ellas se tornen hidrofílicas; consecuentemente, van a absorber el agua que es añadida en el final del procesamiento de alimentos. (ROISINBLIT, 2003)

1.4. Conclusiones

La soya representa una gran opción para el desarrollo de nuevos productos. Esto se debe a su elevado porcentaje de proteínas de alto valor biológico, como a sus componentes bioactivos que pueden actuar como coadyuvantes en el tratamiento de determinadas dolencias, esto es en lo referente al aspecto nutricional. Además presenta excelentes propiedades funcionales que abren la posibilidad para el desarrollo de una gran variedad de productos que se adapten a los hábitos alimenticios, como es el caso de los spreads de soya.

CAPITULO 2

PROTEÍNA DE SOYA

2.1. Desarrollo de la química de las proteínas

La evolución del conocimiento sobre las proteínas y enzimología debe también ser entendida en sus aspectos fundamentales. Las enzimas son proteínas; por lo tanto, la historia de la enzimología de alimentos es un compuesto de avances tanto en la comprensión de la química de la estructura de la proteína y el comportamiento medioambiental, así como en las propiedades físico-químicas (cinética y termodinámica) de la conducta de la enzima. (CHEFTEL y CUQ, 1989).

Durante el período 1820-1840 las purificaciones de proteínas comenzaron a ser realizados por la coagulación de calor, la precipitación con solventes orgánicos y las altas concentraciones de sales, como el sulfato de amonio. (WHITAKER, et al, 2003, 220...)

2.1.1. Composición de aminoácidos

La glicina y leucina fueron los primeros aminoácidos en ser aislados (de gelatina hidrolizada y lana, respectivamente). Esto fue durante la época en que la palabra "proteínas" fue acuñada para describir estos compuestos que tienen como fórmula de composición al carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno, con pequeñas cantidades de azufre y fósforo. La metionina fue descubierta en 1922 y la treonina en 1935. Fue muy difícil determinar la composición de aminoácidos en esos días. Con el descubrimiento en 1952 de Moore y Stein de que los aminoácidos de proteínas hidrolizadas podrían ser separados e identificados con facilidad dentro de las 24 h por cromatografía de intercambio iónico, saber la composición de aminoácidos de las proteínas se convirtió en algo posible. (WHITAKER, et al, 2003)

2.1.2. Estructura organizacional

Al estudiar las proteínas globulares se observa que presentan diferentes estados de ordenación o conformación dentro de su molécula que se engloban en lo que se conoce como las estructuras; las propiedades de estos polímeros, ya sean inmunológicas, enzimáticas, nutricionales, hormonales, etc., dependen fundamentalmente de su conformación, y la pérdida de ésta trae consigo modificaciones de estas propiedades. Por ejemplo, las inmunoglobulinas presentan generalmente una organización muy compleja y en ella se basa su función biológica. Son proteínas muy sensibles que pierden su ordenación con rapidez y por tanto su actividad. Existen cuatro tipos de estructuras en la conformación de las proteínas. Las cuatro estructuras están estabilizadas por los diferentes tipos de uniones químicas, las cuales serán descritas a continuación. (CHEFTEL y CUQ, 1989).

2.1.2.1. Estructura primaria de las proteínas

La prueba real de la importancia del enlace peptídico en las proteínas se dio cuando este enlace que une los aminoácidos individuales en un polímero más largo fue descubierto en 1903 por Emil Fischer, que sintetizó los primeros péptidos. Fischer sintetizó muchos péptidos durante su carrera científica y estableció que los péptidos y las proteínas son el producto de la unión heterogénea de aminoácidos a través de enlaces amida o peptídicos. Los que a su vez se forman por una condensación entre un grupo carboxilo y un amino, con la consecuente eliminación de agua. (BADUI, 1999)

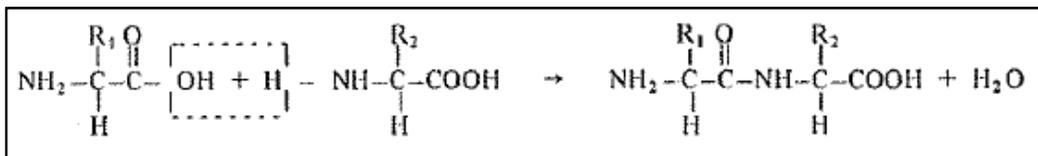


Figura 3: El enlace peptídico

Fuente: BADUI, Salvador. 1999 Química de los alimentos. 2da Edición. Editorial Acribia. 648 pág. España.

La unión de dos aminoácidos genera una molécula llamada dipéptido, la de tres, tripéptido, y así sucesivamente; en general, las cadenas constituidas por pocos monómeros se conocen como péptidos y se producen por la hidrólisis de las proteínas, aun cuando existen varios en estado natural que tienen funciones biológicas muy importantes. Por ejemplo, la anserina (β -alanil-L-metil-L-histidina) y la carnosina (β -alanil-L-histidina) que se encuentran en alta concentración en diferentes tejidos animales en donde actúan como amortiguador de pH; en el pescado, la primera está en mayor proporción que la segunda, y ésta a su vez abunda en el músculo de los mamíferos, por lo que se ha sugerido usar el análisis de estos dipéptidos, para determinar la presencia de algunos tipos de carnes en alimentos.

Existen muchos péptidos más en la naturaleza algunos de los cuales cumplen la función biológica de hormona, como es el caso de la oxitocina y la vasopresina.

La condensación de un mayor número de aminoácidos produce los polipéptidos, o proteínas, que tienen un grupo amino y uno carboxilo terminal correspondiente a los dos aminoácidos que se localizan en los extremos de la cadena; su peso molecular generalmente es mayor de 3 000. (FERNANDEZ, 2002)

Las uniones covalentes son las responsables del enlace peptídico y se producen como resultado de un reparto de electrones entre dos o más átomos; son de menor longitud y las de mayor energía; los puentes salinos o iónicos se crean por atracción coulombica entre grupos cargados con signo opuesto, y son las uniones polares más fuertes que existen, los puentes de hidrógeno aun siendo más débiles, desempeñan un papel muy importante, las fuerzas atractivas de London-Van der Waals se establecen por la inducción de un momento dipolar entre grupos eléctricamente apolares. De todas las uniones covalentes del enlace peptídico, la unión C-N es el más fuerte, y el enlace disulfuro S-S es el más débil ya que requiere de menor energía para su hidrólisis y además es el único que puede romperse sin causar una pérdida de la conformación del polímero y por lo tanto de su funcionalidad.

2.1.2.2. Estructura secundaria

Se refiere a la ordenación regular y periódica de las proteínas en el espacio, a lo largo de su eje o dirección, y que se estabiliza por diversas fuerzas, de las cuales las electrostáticas, los puentes de hidrógeno, las interacciones hidrófobas y las dipolo-dipolo son las más importantes. Existen tres tipos de configuraciones secundarias: configuración helicoidal, configuración en zigzag y configuración de triple hélice de cadenas polipeptídicas

Cuanto más interacciones de esta naturaleza existan, más estable es y más provocan que esos grupos hidrófilos no estén disponibles para reaccionar con las moléculas de agua (también por puentes de hidrógeno), haciendo que el polímero sea poco soluble en este disolvente.

2.1.2.3. Estructura terciaria

Este término se refiere al modo en que la cadena polipeptídica se curva o se dobla tridimensionalmente para producir una estructura estrechamente plegada y compacta característica de las proteínas globulares; a diferencia de las fibrosas, que son moléculas lineales, las globulares tienen sus cadenas compactas con un alto grado de organización y presentan uniones covalentes (disulfuro. S-S), hidrófilas, hidrófobas y también iónicas

2.1.2.4. Estructura cuaternaria

A diferencia de las anteriores, ésta estructura no necesariamente existe en todos los polipéptidos y se refiere a la asociación de dos o más cadenas (iguales o diferentes) a través de uniones no covalentes; pone de manifiesto la disposición con el espacio de las proteínas compuestas por más de una fracción

2.2. Modificación de proteínas para optimizar la funcionalidad

2.2.1. Introducción a la hidrólisis enzimática

Las proteínas se utilizan abundantemente en la industria alimentaria debido a su valor nutricional y propiedades funcionales, como la emulsificación, formación de

espuma, gelificación, la hidratación y propiedades de textura. Estas propiedades funcionales de las proteínas están relacionadas con su estructura molecular y su capacidad para interactuar con otros componentes de la matriz alimentaria.

Idealmente, las proteínas de los alimentos deben poseer una amplia gama de propiedades funcionales. Un mejor conocimiento sobre las relaciones estructura-función e interacciones permite la selección y / o el desarrollo de ingredientes de óptimo desempeño y resultados en los productos alimenticios finales.

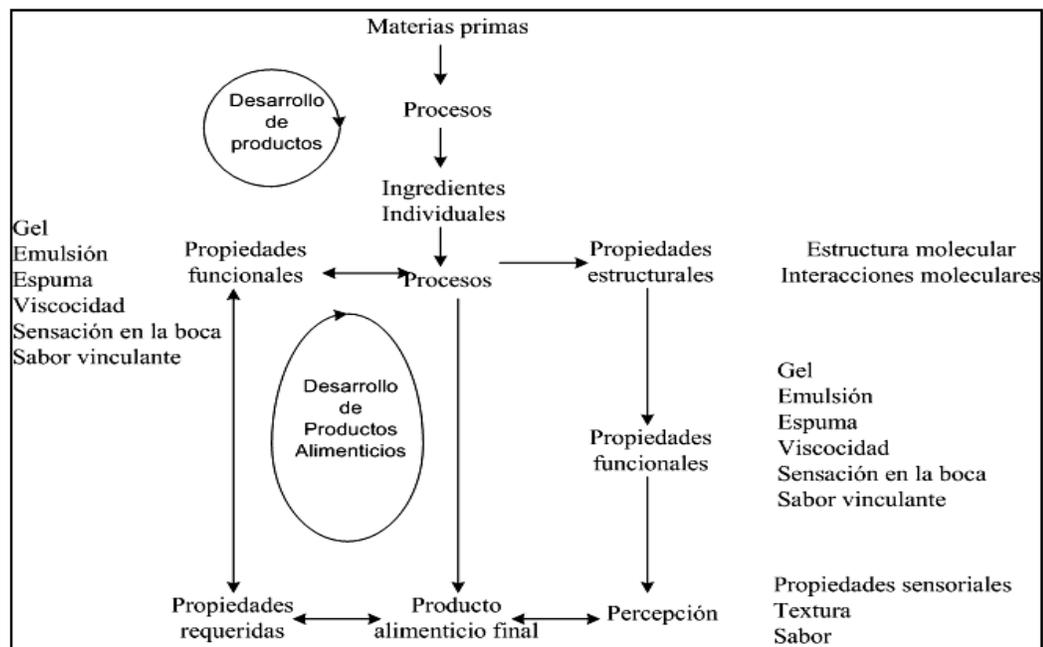


Figura 4: Esquema relaciones estructura-función en los alimentos

Fuente: WHITAKER, Jhon; VORAGEN, Alphons; WONG, Dominic. 2003. Handbook of Food enzymology. Marcel Dekker, Inc. 1052 páginas. United States.

Los ingredientes individuales se combinan y se procesan en un producto alimenticio final. La percepción del producto final está determinada por sus propiedades sensoriales, y estos se ven afectados por las propiedades funcionales de los ingredientes de la matriz alimentaria. Las propiedades funcionales a su vez, se determinan por las estructuras moleculares y las interacciones moleculares de los ingredientes, las que se ven afectadas por las condiciones del proceso. (VACLAVIK, 1998)

La investigación actual en el campo de los alimentos se centra en el conocimiento sobre las relaciones entre las condiciones del proceso, las propiedades estructurales,

propiedades funcionales y las propiedades del producto final. El desarrollo de productos alimentarios a menudo se basa en una definición de las propiedades requeridas o la percepción de los productos finales. Los componentes individuales son seleccionados sobre la base de la propiedad requerida en el producto final y lo que, a menudo empíricamente, se sabe acerca de las propiedades de los ingredientes individuales. Para modificar la percepción del producto final, por lo general se altera un parámetro en la matriz alimentaria, por ejemplo: la concentración, el pH, o en el proceso por ejemplo: temperatura. Si el resultado no es el producto alimenticio buscado, un nuevo ingrediente tiene que desarrollarse sobre la base de un requisito funcional específico. (ROBINSON, 1991)

Los Ingenieros en alimentos pueden utilizar muchos métodos para ampliar el rango de funcionalidad y mejorar determinadas propiedades funcionales de los ingredientes alimentarios. En el caso de las proteínas, tanto los métodos químicos y enzimáticos se pueden aplicar para mejorar esta propiedad. La presente revisión se centra en la hidrólisis enzimática de las proteínas para formar péptidos diferentes a los de la proteína nativa y mejorar la formación de gel de la proteína nativa de soya en los procesos posteriores para la obtención del producto untable de soya. (CIABOTTI, 2007)

2.2.2. Hidrólisis de las proteínas

Las proteínas son polímeros lineales de aminoácidos que están unidos de forma covalente a través de un enlace peptídico. La hidrólisis de las proteínas implica la degradación hidrolítica de este enlace peptídico utilizando álcalis, ácidos o enzimas.

2.2.2.1. La hidrólisis ácida

La hidrólisis ácida se ha utilizado tradicionalmente para fabricar productos de sabor como por ejemplo los hidrolizados de proteína vegetal. Hoy en día el uso de la hidrólisis ácida de las proteínas es limitado debido al riesgo de la formación de cloropropanoles durante la hidrólisis.

2.2.2.2. La hidrólisis alcalina

La hidrólisis alcalina de las proteínas ha sido utilizada para producir espumantes que puedan sustituir las proteínas de huevo o para producir espumas de extintores de incendios.

Ni la hidrólisis ácida ni la alcalina son muy específicas, la tasa de hidrólisis del enlace peptídico está determinada principalmente por la cadena lateral del residuo del aminoácido del enlace peptídico. Además, un número de aminoácidos, por ejemplo, cisteína, serina y treonina, se destruyen y componentes no deseados como la lisinoalanina pueden formarse, la cual se considera implicado en la nefrocitomegalia en ratas, la cual se forma por racimerización de residuos de aminoácidos con la consecuente formación de enlaces pseudopeptídicos.

2.2.2.3. La hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática es mucho más suave que la hidrólisis ácida o alcalina y no conduce a la destrucción de los aminoácidos. También es mucho más específica. Mediante la selección de las enzimas apropiadas la rotura de enlaces peptídicos específicos es posible. Uno de los parámetros clave en la hidrólisis de las proteínas es el grado de hidrólisis (DH). Esto se define como el porcentaje de enlaces peptídicos troceados.

En la hidrólisis enzimática se produce la recondensación de péptidos. Las propiedades reales de un hidrolizado de proteína están determinadas por la longitud de la cadena de los péptidos que involucra un mayor número de aminoácidos formando un complejo polipeptídico con propiedades medicinales de gran potencial que en la actualidad esta generando mucha atención de la comunidad científica.

2.2.1.2.4. Producción enzimática de proteínas hidrolizadas

Para la producción de hidrolizados de proteínas con enzimas, una gran variedad de endo y exopeptidasas están disponibles, así como un gran número de técnicas de procesamiento.

Una visión esquemática se muestra en la figura No 5. Una proteína con una composición y secuencia de ciertos aminoácidos es hidrolizada por una o más enzimas cada una con una cierta especificidad y actividad.

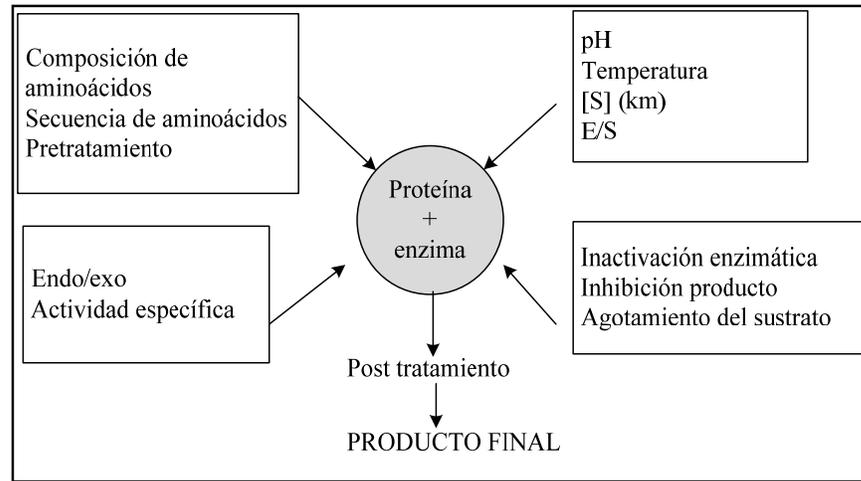


Figura 5: Visión esquemática de los procesos de hidrólisis enzimática

Fuente: WHITAKER, Jhon; VORAGEN, Alphons; WONG, Dominic. 2003. Handbook of Food enzymology. Marcel Dekker, Inc. 1052 páginas. United States.

Antes de la hidrólisis de la proteína la materia prima puede recibir un tratamiento previo de calentamiento. La reacción de hidrólisis depende del pH, la temperatura y las concentraciones de sustrato y la enzima. Durante la hidrólisis aumenta el grado de la misma y fenómenos tales como la inactivación enzimática y la inhibición del producto empieza a jugar un papel importante. Después de la hidrólisis, la enzima debe ser inactivada. El conocimiento sobre las relaciones entre las propiedades del producto final y las condiciones de proceso permite el control de la reacción y hace posible la producción de hidrolizados que se adapta de forma óptima en su aplicación final.

Tabla 3: Enzimas endopeptidasas con relevancia industrial

Enzima	Numero EC	Divisiones preferenciales
Serina proteasas	3.4.21	
Quimotripsina	3.4.21.1	tyr, trp-, phe-,leu-
Tripsina	3.4.21.4	arg-,lys-
Subtilisina	3.4.21.12	Principalmente ala, val
Cysteina proteasas	3.4.22	
Catepsina B	3.4.22.1	arg-, lys-, phe-X
Papaína	3.4.22.2	arg-, lys-, phe-X
Ficina	3.4.22.3	phe-, tyr-
Bromelina	3.4.22.4	lys-,arg-, phe-,tyr-
Aspartico proteasas	3.4.23	
Pepsina	3.4.23.1	aromatic-, leu-, asp-,glu-
Quimosina	3.4.23.4	phe-met, uniones en <i>k</i> -casein
Metalo proteasas	3.4.24	
Termolisina	3.4.24.27	ile-, leu-, val-, phe-
Proteinasa neutral	3.4.24.28	leu-, phe-, y otros

2.3. Principales fuentes de proteína

Las proteína de uso común son las proteínas de la leche, de la carne, y proteínas vegetales como de la soya y el gluten. Recientemente, la proteína de arroz y de guisante también se están utilizando. Las proteínas del pescado son también con frecuencia hidrolizadas pero su aplicación principal es en la alimentación animal.

El perfil de aminoácidos de la proteína de las materias primas no sólo determina las propiedades nutricionales del hidrolizado final, sino que también afecta en qué medida y con qué facilidad puede ser hidrolizado por una peptidasa dada. Se ha demostrado que las proteínas con un alto contenido de aminoácidos hidrofóbicos fueron más fácilmente hidrolizadas por una enzima. La estructura de la proteína, su solubilidad, y su estado de desnaturalización, influyen en el proceso de hidrólisis.

En su forma simplificada la hidrólisis de una proteína procede de acuerdo con el esquema propuesto originalmente por Linderström-Lang (WHITAKER, et al, 2003).

Se supone que la proteína nativa y desnaturalizada (desarrolladas ambas de forma todavía reversible), están desplegadas y en estado de equilibrio (en parte), y que solo desplegadas de esa forma puede ser hidrolizada por una enzima en una forma intermedia que luego se hidroliza a los productos finales.

Básicamente dos tipos de reacciones se pueden distinguir pero en los procesos de hidrólisis real pondrían también existir reacciones intermedias entre estos dos tipos.

- En el tipo de reacción uno-a-uno se determina el índice general de la hidrólisis por el primer paso en el proceso, el despliegue reversible de la molécula. El equilibrio está en gran medida en el estado nativo pero una vez que una molécula de proteína nativa (en parte) expone un enlace peptídico, esta puede ser escindida, y la molécula se vuelve inestable, y más enlaces peptídicos están expuestos y el producto intermedio puede ser degradado rápidamente en muchos pequeños péptidos.
- En el tipo de reacción de cierre, las proteínas se transforman rápidamente en las formas intermedias. El paso limitante de la velocidad es la lenta degradación en los productos terminados.

Para los procesos de hidrólisis que procede de acuerdo a la reacción de uno por uno la reacción de desnaturalización de la proteína (por ejemplo, un tratamiento térmico) se desplazará del equilibrio para el lado de la "desnaturalización", y la velocidad de reacción inicial incrementa. La desnaturalización extensa, sin embargo, impide la solubilidad de la proteína debido a la agregación molecular, y esto disminuye ligeramente la tasa de hidrólisis.

2.3.1. Condiciones de la reacción

Las condiciones de la reacción tales como pH, temperatura, tiempo de hidrólisis y concentración de la enzima y el sustrato se seleccionan en función del grado necesario de hidrólisis (DH) del producto final y el pH y la temperatura óptima de la enzima.

2.4. Control del proceso de hidrólisis

Para controlar la reacción de hidrólisis es necesario controlar los DH durante la reacción. Esto se puede hacer con una serie de métodos de los cuales los más comunes son el pH-stat, la medición del aumento de la solubilidad, la medición de la osmolaridad, y la determinación de la cantidad de nitrógeno formado.

2.4.1. pH stat

Luego de la hidrólisis del enlace peptídico se forman un carboxilo libre y un grupo amino libre ya que se ioniza en función del pH de la reacción.

A valores de $\text{pH} > 6$, el grupo carboxilo lanzará un ion H^+ y el pH de la mezcla de reacción se reducirá.

A valores de $\text{pH} < 5$, el grupo carboxilo se ocupará de un ion H^+ y el pH de la mezcla de reacción aumentará.

En el rango de 5-6 el pH no variará mucho. Por encima de pH 9 los H^+ son liberados del grupo amonio del péptido.

Cuando la reacción de hidrólisis se lleva a cabo a valores de pH fuera del rango de pH 5-6 y se mantiene constante durante la hidrólisis, la cantidad de álcalis o ácidos necesarios para mantener el pH es una medida de la cantidad de enlaces peptídicos hidrolizados. Este método llamado “pH estadística” es una herramienta importante en los experimentos a escala de laboratorio (WHITAKER, et al, 2003)

2.4.2. Osmometría

Tras la hidrólisis, péptidos solubles son liberados. Como consecuencia el punto de congelación de la mezcla de reacción se reduce. La depresión del punto de congelación se puede correlacionar con la DH. En cada serie de reacciones, sin embargo, el crioscópio tiene que ser calibrado en una determinación independiente de la cantidad de nitrógeno amino liberados (a través de TNBS, la titulación formol, o OPA). Aunque no es un método continuo que puede llevarse a cabo rápidamente. Sin embargo, el método sólo toma en cuenta péptidos solubilizados y en

consecuencia el DH de observación podrá ser inferior a la DH real. (WHITAKER, et al, 2003).

2.4.3. Determinación de la cantidad de nitrógeno amino

“El aumento en el número de grupos amino nitrógeno puede ser monitoreado por la toma de muestras y su respectivo análisis, tal como se realiza también en los métodos OPA, la titulación formol y el TNBS.

El conocimiento y la comprensión de la relación entre el tiempo de hidrólisis, la cantidad de enzimas, y el grado de hidrólisis permiten el control de la velocidad de reacción”. (WHITAKER, et al, 2003, 240...)

A pesar de muchos intentos, sin embargo, todavía no es posible dar descripciones cuantitativas del proceso de hidrólisis. Esto se relaciona con la complejidad de las reacciones en términos de especificidad y la composición del sustrato.

Con 20 aminoácidos diferentes, 400 enlaces peptídicos diferentes se pueden formar, para cada uno de los cuales la enzima tiene una afinidad y velocidad diferente de hidrólisis.

En primer lugar los enlaces peptídicos para los que la enzima tiene la mayor afinidad se romperán, seguido por aquellos para los que la afinidad es menor. Además, algunos enlaces peptídicos están enterrados dentro de la estructura terciaria y necesitan estar expuestos para ser hidrolizados.

En estudios cinéticos el mayor incremento en DH se lleva a cabo en los primeros 30 minutos de la reacción. Tal como se puede ver en la siguiente en la figura 7

A partir de entonces la velocidad de reacción se ralentiza. Un mayor tiempo de hidrólisis y el uso de más enzima resultarán en una DH superior. Numerosos estudios son publicados en los cuales un modelo empírico para la hidrólisis de las proteínas ha sido desarrollado. Estos modelos se basan tanto en la cantidad de proteína solubilizada o en el grado de hidrólisis. (WHITAKER, et al, 2003)

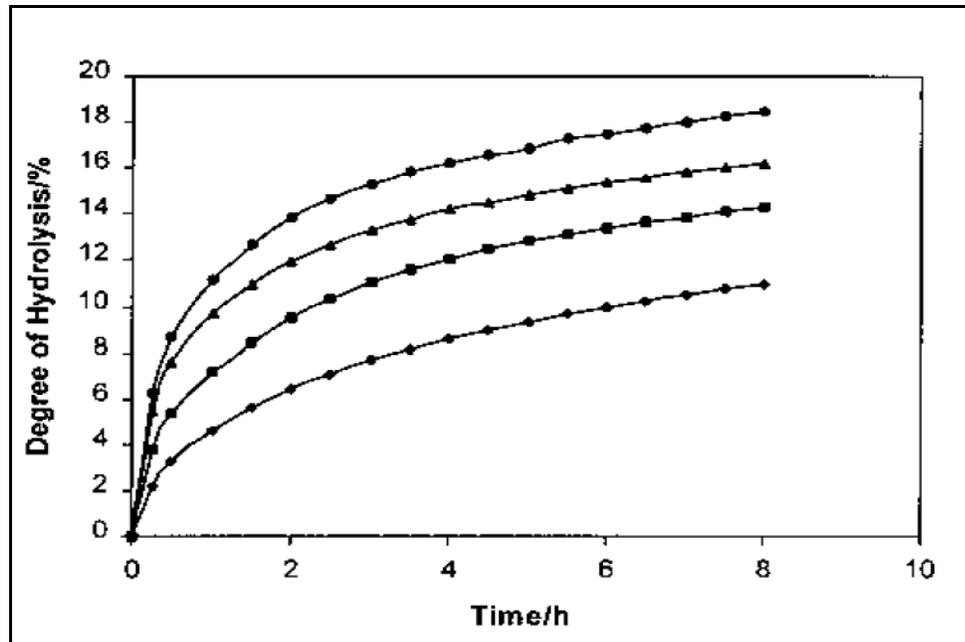


Figura 6: Función hidrólisis

Fuente: WHITAKER, Jhon; VORAGEN, Alphons; WONG, Dominic. 2003. Handbook of Food enzymology. Marcel Dekker, Inc. 1052 páginas. United States.

2.5. Aplicaciones

Intactas, las proteínas nativas suelen tener estructuras tridimensionales bien definidas que afectan a sus propiedades funcionales. Los péptidos son mucho más pequeños, la estructura molecular es más aleatoria, y una estructura terciaria rara vez se observa.

Para la estructura secundaria de proteínas, las α -hélices y las β -hojas plegadas son las estructuras más importantes. Los péptidos en general no tienen una gran longitud para tener suficientes enlaces H para estabilizar la hélice. Cuando sucede la hidrólisis de las proteínas de las zonas hidrofóbicas, que normalmente están enterradas dentro de la molécula plegada, estas quedan expuestas y como consecuencia las propiedades de una proteína hidrolizada son muy diferentes de los de la proteína original.

Las proteínas enzimáticamente hidrolizadas tienen aplicaciones en una amplia gama de alimentos y productos no alimentarios, que se refieren o bien a sus propiedades nutricionales o a sus funcionales. Péptidos amplios (2-5 kDa) se utilizan principalmente como ingredientes funcionales o en productos de cuidado personal. Péptidos de tamaño mediano (1-2 kDa) se utilizan en la nutrición clínica y nutrición

de los deportistas, péptidos más pequeños (<1 kDa) se utilizan en productos para alimentación infantil que requieren una alergenicidad reducida y para la fermentación en medios de cultivo.

2.5.1. Propiedades nutricionales

2.5.1.1. Valor nutricional

Los valores nutricionales se determinan principalmente por la cantidad de aminoácidos esenciales en el hidrolizado de proteínas y sobre todo depende de la composición de aminoácido de la proteína de las materias primas. Bajo ciertas condiciones se requiere una composición específica de aminoácidos. Por ejemplo, los productos para los pacientes que sufren de fenilcetonuria deben ser muy bajos en fenilalanina (RIDNER, 2006). Estos productos son producidos a partir de proteínas altamente hidrolizadas y son sometidos a tratamientos posteriores específicos, como tratamientos de adsorción con carbón o resinas de cromatografía para eliminar la fenilalanina (MATEOS,-APARICIO 2008). Otro ejemplo son los hidrolizados con un contenido alto de glutamina. La glutamina es considerada como un aminoácido condicionalmente esencial que se requiere en los períodos de estrés físico, como un traumatismo grave, cirugía, infección, hambre, o entrenamiento pesado. Péptidos ricos en glutamina son cada vez más utilizados para la nutrición celular. En general estos productos son producidos a partir de gluten de trigo, que contiene glutamina en un 27%. (CHEFTEL, 1989)

Con respecto a la nutrición de los deportistas se ha demostrado que los hidrolizados de proteína tienen la facultad de estimular la recuperación después del ejercicio intensivo y prolongado. Durante el ejercicio de alta intensidad, los atletas usan sus reservas de glucógeno, y el tiempo necesario para restablecer sus niveles de glucógeno muscular determina el tiempo necesario para recuperarse de la fatiga. Aunque la liberación de insulina es estimulada principalmente por hidratos de carbono, la liberación de insulina se ve estimulado por las proteínas y péptidos, resultando en un aumento de la captación de la glucosa de la sangre, una tasa de aumento de la síntesis de glucógeno, y por lo tanto una recuperación mejorada luego de mucho tiempo de ejercicio intensivo (WHITAKER, et al, 2003).

Contrariamente a las proteínas, los péptidos son estables al calor y puede ser aplicado en leche pasteurizada, como las bebidas listas para usar.

Por otra parte, los péptidos son solubles en un amplio rango de pH, lo que les permite ser utilizado en las bebidas refrescantes.

No sólo es el valor nutricional determinado por la composición de aminoácidos, sino también la distribución péptido-longitud de la cadena parece ser un factor importante.

Algunas bacterias del ácido láctico, por ejemplo, prefieren di y tripéptidos más que los aminoácidos libres. Además, en el intestino delgado humano la mayoría de las proteínas de la dieta son absorbidas como péptidos pequeños. Hay mecanismos de transporte específicos para pequeños péptidos que son independientes del transporte para la captación de aminoácidos libres. Estos péptidos pequeños son más adecuadamente absorbidos en el intestino delgado que sus aminoácidos libres equivalentes. Esto permite la formulación de productos para la nutrición enteral que da menos molestias intestinales (RODRÍGUEZ, 2007)

2.5.1.2. Reducción de la alergenicidad

La alergenicidad alimentaria es un tema complejo, y las manifestaciones de la enfermedad y los métodos de diagnóstico son muy variables. En la mayoría de las respuestas alérgicas una inmunoglobulina específica, IgE, interviene en la reacción de hipersensibilidad inmediata. Las inmunoglobulinas, también llamadas anticuerpos, son producidas por el cuerpo en respuesta a las invasiones de los compuestos extraños, como las proteínas. Los materiales que provocan la producción de anticuerpos, excepto la IgE, en un organismo se llaman antígenos.

Un antígeno puede contener varios antigénicos determinantes, llamados epítopos, que son pequeñas regiones de la molécula de antígeno que desencadena específicamente la producción de anticuerpos contra el cual se une el antígeno. En el caso de que un antígeno provoque una respuesta de IgE específica, el antígeno se llama un alérgeno. A fin de iniciar una manifestación clínica de las respuestas alérgicas, se requiere que la forme IgE un puente entre dos epítopos; el alérgeno lo que deberían tener es al menos dos epítopos a cierta distancia unos de otros. La destrucción de la estructura molecular del alérgeno o antígeno constituye la base de la aplicación de hidrolizados de proteínas en el control de las alergias alimentarias.

Disminuir el tamaño de las moléculas a través de la hidrólisis reduce el número de moléculas de proteínas con dos epítomos, e incluso puede destruir epítomos, lo que reducirá la antigenicidad (MATEOS,-APARICIO, 2008).

2.5.2. Propiedades funcionales

Las proteínas y los péptidos son más que una fuente de nutrientes esenciales. También tienen propiedades funcionales que les permitirán contribuir a las propiedades sensoriales del producto final. (ZAIGUI y HONGZHUO, 2009)

2.5.2.1. Propiedades de Superficie

Durante la formación de emulsiones o espumas, la energía se aplica para dispersar, deformar, y romper las gotitas de aceite o burbujas de aire en una fase acuosa. Para cumplir con estos requisitos tienen que utilizarse agentes tensoactivos. Los agentes tensoactivos son adsorbidos en la interfase aceite-agua (en las emulsiones) o interfase aire-agua (en las espumas) y bajan la tensión interfacial. Diferentes aspectos, sin embargo, juegan un papel en la formación, por un lado y la estabilización de espumas y emulsiones por otro. (ZAIGUI y HONGZHUO, 2009)

Las propiedades más importantes para una buena emulsión o agente espumante por lo tanto son la capacidad de reducir rápidamente la tensión interfacial y la capacidad de formar una película viscoelástica que es resistente a la ruptura. Estas dos propiedades, sin embargo, están relacionadas.

Las modificaciones de las proteínas por la vía de hidrólisis parcial o por la rotura de los puentes disulfuro intramolecular, en general, dará lugar a un mayor despliegue de la molécula. Esto aumentará la flexibilidad y mejorará la capacidad de reducir rápidamente la tensión interfacial y mejorará la formación de espuma y las propiedades emulsificantes, pero reducirá la capacidad de formar una película coherente y reducirá las propiedades de estabilización.

Para buenas propiedades superficiales un péptido debería tener agrupadas y cargadas las zonas hidrofóbicas y un peso molecular por encima de un cierto mínimo para permitir esta distribución. (TORREZAN, 2008)

2.5.2.2. Gelificación y agregación de agua.

La formación de un gel requiere grandes moléculas de proteína que puede formar enlaces cruzados en las tres dimensiones. La fuerza y la dureza de un gel están relacionadas con el tamaño y la forma de la molécula y no con la composición de aminoácidos. La hidrólisis de las proteínas, lo que reduce es el tamaño de las moléculas, por lo tanto se esperaría que reduzca la capacidad de formar un gel. Sin embargo, se ha demostrado que la hidrólisis de la proteína de suero o caseína puede dar lugar a la formación de agregados y la formación de un gel siempre y cuando la hidrólisis sea realizada en grado parcial. (TORREZAN, 2008)

2.5.2.3. Solubilidad

La hidrólisis parcial de las proteínas se utiliza a menudo para mejorar la solubilidad de una proteína. Para la solubilización óptima de la proteína de soya, estudios recomiendan un DH de alrededor de 8%. Un 100% de solubilidad, sin embargo, nunca se consigue, lo que se relaciona en parte a las interacciones péptido-péptido- y en parte a la presencia de estructuras compactas en la proteína que no pueden ser hidrolizados

Aunque los péptidos, como tal, pueden ser solubles, en una aplicación final de la hidrólisis se pueden formar complejos insolubles debido a interacciones con otros ingredientes en la matriz alimentaria (LEMOS, 2005).

2.5.3. Propiedades organolépticas

En las aplicaciones en alimentos, el gusto y el olfato son parámetros muy importantes. Cuando las proteínas de alimentos se hidrolizan generalmente se desarrollan un sabor amargo y un sabor salado. Además, los hidrolizados de proteínas llevan con frecuencia el sabor y olor característicos de la materia prima de la que se derivan. El sabor salado está relacionado con la presencia de péptidos pequeños y aminoácidos libres. La amargura se relaciona con el tamaño y la

hidrofobicidad media de los péptidos. Esto se puede calcular utilizando los valores hidrofobicidad de los aminoácidos individuales como se informa en la literatura. (RODRÍGUEZ, 2007)

2.6. Conclusiones

La hidrólisis controlada de la proteína de soya constituye un buen camino para mejorar sus características nutricionales. Con una hidrólisis parcial se pueden obtener polipéptidos de gran utilidad para dietas especiales que ayuden al organismo en la recuperación del cansancio físico y otras condiciones. Además con una hidrólisis parcial de la proteína de soya podemos mejorar sus propiedades funcionales tales como, la capacidad de gelificación, y emulsión.

CAPITULO 3

GELIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA DE SOYA

3.1. Introducción.

La capacidad de las diversas proteínas para formar geles de diferentes estructuras es muy importante para la industria alimentaria. (BADUI, 1999). Las propiedades de textura de muchos productos alimenticios tales como el queso, el yogur y salchichas están directamente relacionadas con el tipo de gel formado durante su producción.

El proceso de gelificación por calentamiento consiste en dos pasos: un despliegue inicial de las moléculas de proteína (calor), seguida por una etapa de agregación (refrigeración). Las proteínas se calientan para promover la desnaturalización y la interacción molecular, ya que en esta etapa se produce la ruptura de puentes de hidrógeno, la reducción de las interacciones electrostáticas, el debilitamiento de las interacciones intermoleculares, y la estabilización de las interacciones hidrofóbicas estableciéndose las asociaciones a favor de las moléculas en una estructura tridimensional durante el enfriamiento (ZAIGUI y HONGZHUO, 2009)

Si estas interacciones llevan a la conformación de una red tridimensional capaz de englobar moléculas de agua, entonces ocurrirá la formación del gel. Si las interacciones de la red son de naturaleza débil, la viscosidad puede aumentar y permitir el flujo de fluido, causando la interrupción de la red. Si las interacciones proteína-proteína son demasiado fuertes, la red se rompe y el agua será expulsada. Un equilibrio de fuerzas para constituir la red y de las fuerzas repulsivas para evitar el colapso de la red son necesarios para la formación de gel.

La gelificación supone un cambio en el estado macroscópico de la materia, llamada estado de "transición" de sol a gel. Desde el punto de vista físico de polímero, la formación de gel se procesa vía transición de un estado molecular desordenado a un estado más o menos ordenado en la red. El punto de "gel" (punto de gelificación) representa el instante en que la solución se convierte en un producto viscoelástico. (FERNANDEZ, et al, 2002)

3.2. Gelificación de la Proteína de soya

Los granos de soya se caracterizan por contener cerca de un 20% de aceite y 40% proteínas. El aceite y gran parte de la proteína se encuentran en corpúsculos especiales contenidos en las células del cotiledón. La mayoría de las proteínas de soya se clasifican como globulinas. Estas proteínas son insolubles en agua en su punto isoeléctrico, pero se disuelven en agua o soluciones diluidas de sal en valores de pH por encima o por debajo de dicho punto isoeléctrico que está ubicado a un pH de 4,5. Las proteínas de soya, cuando están en solución, han demostrado ser sensible al tratamiento por calor.

Las proteínas de soya son una mezcla de macromoléculas de tamaños, densidades de carga y estructuras diferentes. Los pesos moleculares de las proteínas de soya varían desde 8.000-600.000 Da, con una mayor concentración en el rango 110000-350000 Da. La separación de proteínas por ultracentrifugación presenta fracciones cuyos coeficientes de sedimentación S (unidades Svedburg, a 20° C en agua) son 2, 7, 11 y 15. Este análisis ha demostrado que las fracciones del 11S y 15S solo constan de proteína pura. La fracción 2S, representa aproximadamente el 20% de la proteína, se compone de proteínas biológicamente activa, inhibidores de la tripsina y las globulinas 2S. Las fracciones 7S y 11S en conjunto representan alrededor del 70% de las proteínas contenidas en las semillas de soya. La fracción 7S se compone de las enzimas amilasa y b-lipoxigenasa, hemaglutinina y Citocromo C y la globulina conocido como b-conglicinina (una glucoproteína de reserva). La globulina 11S, es la proteína de reserva, que constituyen alrededor del 37% de la proteína de soya. La fracción 15S (globulina 15S) conforma alrededor del 10% del total de proteínas (CIABOTTI, 2007).

En general, la fracción 11S contiene tres o cuatro veces más metionina y cisteína por unidad de proteína que la fracción 7S. Desde el punto de vista nutricional la fracción 11S es muy valiosa, porque la soya es deficiente en aminoácidos azufrados. Algunos estudios indicaron la importancia de los grupos SH y SS en las propiedades funcionales de las proteínas, esenciales en el proceso de gelificación y la coagulación de las proteínas. La fracción 11S tiene mejor capacidad de formar gel en comparación con la fracción 7S, y la segunda muestra más capacidad y estabilidad de la emulsión.

La gelificación térmica o inducida por el calor, más concretamente, coagulación de las proteínas se describe en dos pasos que involucran el desdoblamiento inicial de la proteína, seguido de las reacciones de asociación, que forman la estructura del gel a través de enlaces covalentes, principalmente puentes disulfuro entre cisteínas, enlaces de hidrógeno, enlaces iónicos y atracciones hidrofóbicas.

El proceso de coagulación de la proteína del extracto de soya se produce de una manera similar a la del suero de leche los cuales son sometidos a calentamiento y al uso de agentes coagulantes, ya sea mediante la adición de sal como por la adición de sustancias ácidas. Los agentes coagulantes de uso frecuente para la coagulación de las proteínas de soya son las sales de calcio y magnesio o agentes acidificantes como la glucono-delta-lactona (COCIO, 2006).

El calentamiento del extracto hidrosoluble de soya es un requisito previo para la formación de la estructura del gel de proteína. El calor es esencial para desnaturalizar las proteínas que expondrán sus regiones hidrofóbicas y grupos sulfhidrilo para facilitar la obtención de una coagulación eficiente.

La coagulación de las proteínas de soya para obtener el queso de soya ocurre cuando ellas son insolubilizadas irreversiblemente como resultado del desdoblamiento de las moléculas que son atraídas por la neutralización de sus cargas para formar puentes intermoleculares, cuando sales añadidas o agentes acidificantes son adicionados (CIABOTTI, 2007).

3.2.1. Coagulantes involucrados en el proceso de gelificación de la leche de soya:

A los coagulantes involucrados en el proceso de gelificación de la leche de soya se los puede dividir de dos formas: por el tipo de gelificación siendo esta ácida o iónica y por la velocidad de gelificación.

3.2.1.1. Por el tipo de gelificación:

3.2.1.1.1. Gelificación ácida: Dentro de este grupo tenemos al más importante que es la Glucono-delta-lactona, al que posteriormente nos referiremos como (GDL)

3.2.1.1.2. Gelificación iónica: dentro de este grupo encontramos sales bivalentes: Sulfato de calcio ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), Cloruro de calcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), Cloruro de Magnesio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) y Sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).

3.2.1.2. Por la velocidad de gelificación podemos agruparlos de la siguiente forma:

3.2.1.2.1. Coagulantes de actividad lenta: aquí tenemos al CaSO_4 y la GDL.

3.2.1.2.1. Coagulantes de actividad rápida: encontramos es ente grupos al CaCl_2 y al MgCl_2

3.2.2. Coagulación con sales de iones

En la coagulación con sales de iones de calcio o magnesio, que son adicionados al extracto de soja añadido caliente ($75\text{-}80^\circ\text{C}$) ocurre la coagulación de las proteínas, como resultado de la disminución de las cargas negativas de la proteína por la unión de los iones positivos con aminoácidos cargados negativamente en las moléculas de proteína. En consecuencia, la molécula abierta es capaz de agregar agua, debido a la repulsión electrostática y de esa forma la coagulación es irreversible (ZAIGUI y HONGZHUO, 2009).

3.2.3. Coagulación ácida.

En la coagulación ácida, las cargas negativas de las proteínas se reducen por protonación del-COO-ácido con residuos de aminoácidos. El coagulante Glucono-delta-lactona se hidroliza a ácido glucónico, que actúa como agente acidulante. La adición de coagulantes ácidos como el ácido acético o láctico, conduce a la rápida disminución en el pH, que puede agregar proteínas muy rápidamente, tornando débiles las fuerza de repulsión y liberando el agua protonada (H_3O^+). Existiendo uniones de calcio con el grupo carboxilo de la proteína que puede proporcional más asociación de proteína tornando a la matriz proteína más densa y compacta.

En la siguiente tabla se presentan una tabla comparativa sobre los diferentes coagulantes aplicados para la gelificación de la proteína de soya.

Tabla 4: Diferentes compuestos utilizados para la gelificación de la proteína de soya.

Tipo de coagulante	Temperatura de Extracto de soya (°C)	Solubilidad	Ventajas	Desventajas
Sulfato de Calcio (CaSO ₄ ·2H ₂ O) (2CaSO ₄ ·H ₂ O)	80-85	Baja	Buen color y textura suave; alto rendimiento en retención de agua la capacidad de tofu; Rápida coagulación; Barato.	Difícil disolver en agua, no se produce en el país sulfato de calcio de grado alimentario
Cloruro de Calcio (CaCl ₂ ·2H ₂ O)	75-80	Alta	Rápido tiempo de coagulación Fácil drenaje de agua.	Textura cruda, bajo rendimiento de tofu
Cloruro de Magnesio (MgCl ₂ ·6H ₂ O)	75-80	Alta	Buen sabor Alta fuerza de coagulación.	Textura cruda, bajo rendimiento de tofu
Glucono Delta Lactona (GDL) (C ₆ H ₁₀ O ₆)	85-90	Alta	Alto rendimiento Fácil de disolver de manera uniforme	Sabor agrio; textura dura pero fácil de romper, muy costoso y no se produce en el país.

Fuente: ZAIGUI, Li; HONGZHUO, Tan. 2009. Traditional Chinese foods: production and research progress. Nova Science Publishers, Inc. 353 páginas. United States.

Expertos en la elaboración de queso de soya (tofu) señalan que la solidez del queso elaborada con un 0,4% CaSO₄, presenta una estructura más uniforme y continua, obteniendo el máximo rendimiento, solidez y recuperación de proteínas, y la mejor capacidad de retención de agua.

Generalmente el CaCl_2 y el MgCl_2 resultan en un cuajo más duro y frágil que el cuajo a partir del sulfato de calcio o magnesio. Entonces se sugiere que los aniones tienen un efecto más fuerte en cuanto a capacidad de retención de agua que los cationes.

Por otro lado el coagulante más elegido entre los elaboradores del tofu es el sulfato de calcio, por la firmeza apropiada que le entrega al tofu, también se puede utilizar la Glucono-delta-lactona (GDL) para hacer un tofu suave, pero no es apropiado para la firmeza.

Existen métodos para la determinación óptima de la concentración de coagulantes tales como la luz de transmitancia (%T) del suero, volumen de suero y rendimiento del producto que son medidos después de completada la coagulación (COCIO,2006). Tanto el tipo de coagulante, como la concentración de éste afectan la naturaleza del producto. La cantidad de coagulante adicionado en la elaboración del queso es uno de los puntos críticos de control, y determina crucialmente la textura y rendimiento.

3.3. Toxicidad de los coagulantes más importantes

3.3.1. Cloruro de Calcio:

El cloruro de calcio es fácilmente dissociado en calcio y cloro dentro del agua. La absorción, la distribución y la excreción de los iones en animales son reguladas separadamente. El cloruro de calcio ejerce propiedades irritantes cuando la persona entra en contacto directamente con el compuesto.

Una vez que el cloruro de calcio ha sido ingerido, el efecto de la sustancia en animales podría ser atribuido al efecto de los iones de calcio, el efecto de los iones de cloro, o ambos.

La homeostasis y mecanismos de acción de los iones de calcio y cloro son bien revisados en los textos estándar de farmacología, fisiología, bioquímica y nutrición. Su código alimentario es el E-509

3.3.1.1. Metabolismo, biotransformación y cinética

3.3.1.1.1. Calcio

El calcio es el constituyente inorgánico más abundante de todas las especies animales y ha tenido un importante rol en la nutrición de animales. En los adultos humanos el total de calcio en el cuerpo es de aproximadamente 830 -1100gr.

El 55% del calcio es retenido en el esqueleto. El sistema hormonal mantiene una relativamente constante concentración de calcio en alrededor de 100ug/ml en el plasma para controlar la absorción intestinal del calcio en la dieta, la pérdida de calcio de los huesos, y la absorción o excreción renal. El exceso de calcio es excretado en la orina vía filtración glomerular. Los túbulos renales son capaces de excretar tan bien la reabsorción de calcio.

De este modo los túbulos son capaces para eficientemente producir una pronta excreción de calcio para lograr la homeostasis cuando niveles anormales de calcio son ingeridos. Un incremento significativo en la concentración de calcio en el plasma podría ocurrir solo después de una alta ingestión de calcio en conjunción con otros desordenes que alteren la homeostasis de calcio tales con insuficiencia renal y hipertiroidismo primario. (KAWAMURA y HATTORI, 2002).

3.3.1.1.2. Cloruro

El cloruro es el más importante anión en las especies animales. En los humanos adultos, el total de cloruro en el cuerpo es de aproximadamente 70-95gr. 80% del cloro esta localizado extracelularmente. La concentración intracelular de cloruro es aproximadamente 100-140 ug/ml.

La concentración de cloruro en el plasma es mantenida alrededor de 3,55 -3,90 mg/ml aun cuando es absorbido eficientemente del intestino

El cloruro es excretado de la luz tubular renal por el sistema de transporte activo y también por la difusión pasiva. (KAWAMURA y HATTORI, 2002).

3.3.1.2. Mecanismo de acción

3.3.1.2.1. Calcio

El calcio es indispensable para la formación y mantenimiento de huesos y dientes, y para la regulación de diversas funciones fisiológicas en todas las especies animales. Estos incluyen la regulación de la transmisión neuronal y la contracción muscular, la coagulación de la sangre, integridad de la membrana celular, la actividad de varias enzimas, y la regulación del equilibrio ácido-base

3.3.1.2.1. Cloruro

El cloruro es importante en la regulación osmótica y los balances ácido-base de los líquidos corporales.

El Cloruro mantiene la neutralidad electroquímica mediante el intercambio de aniones con bicarbonato en el transporte de CO₂ en la sangre.

El calcio y el cloruro son componentes esenciales del cuerpo de todas las especies animales. El calcio es esencial para la formación de esqueletos y la regulación de la transmisión nerviosa, contracción muscular y la coagulación de la sangre. El cloruro es necesaria para regular la presión osmótica intracelular y el amortiguamiento. (KAWAMURA y HATTORI, 2002)

3.3.1.2. Toxicidad:

Hay varios estudios fiables sobre la toxicidad aguda. Los resultados de los estudios se resumen de la siguiente manera:

El DL50 de cloruro de calcio para los ratones y las ratas se determinó mediante la administración de la sustancia por vía oral a los grupos de 15 animales. Los valores de LD50 se determinaron por el método de arriba hacia abajo y después de un periodo de observación de tres días. Aunque la autopsia no fue descrita, la DL50 oral osciló entre 3798 (masculino) y 4179 mg / kg de peso corporal (mujeres) en las ratas a 2045 (masculino) y 1940 mg / kg de peso corporal (mujeres) en ratones. (KAWAMURA y HATTORI, 2002).

3.3.2. Cloruro de Magnesio.-

El cloruro de magnesio o $MgCl_2$ es un compuesto iónico a base de cloro, cargado negativamente, y magnesio, cargado positivamente. El cloruro de magnesio puede extraerse de salmueras o del agua de mar y es una gran fuente de magnesio, es obtenido por electrólisis.

El Cloruro de Magnesio es también conocido como Nigari. El Nigari ha sido el coagulante más común en Japón desde hace miles de años. La solubilidad de este compuesto incluso en el de estado sólido es muy alta y la acción del coagulante es muy rápida. Es una sal altamente higroscópica por lo que es necesario tomar las precauciones durante su almacenamiento. El Nigari deber ser añadido muy lentamente y el extracto de soya debe ser movida de manera adecuada.

En el caso del cloruro de magnesio, los estudios que sobre el se presentan, no establecen toxicidad alguna. Su Código es el E-511. (FAO/WHO, Junta de Expertos 1998)

3.3.3. Glucono Delta Lactona

El coagulante Glucono Delta Lactona (GDL) se clasifica como un hidrato de carbono derivado de la glucosa, con la fórmula molecular de $C_6H_{10}O_6$, presentado las siguientes características: forma de polvo fino, blanco, cristalino y prácticamente inodoro. A menudo es soluble en agua y, como tal, se hidroliza a ácido glucónico. Puede ser obtenido por la oxidación de la D-glucosa con agua de bromo, por la oxidación de microorganismos no patógenos y no tóxicos para el hombre o los animales y por la oxidación de D-glucosa por las enzimas derivadas de estos microorganismos. Su código es E-575.

Las estructuras de la Glucono Delta Lactona y el producto hidrolizado "ácido glucónico" se ilustra en la Figura 7. Este gráfico justifica el porque ejerce una mayor retención de humedad debido a la gran cantidad de hidroxilos presentes en su molécula, que van a proporcionar más enlaces hidrógeno con el agua.

El coagulante Glucono Delta Lactona es gradualmente hidrolizado a ácido glucónico en disolución especialmente a altas temperaturas, dando como resultado un descenso del pH hasta el equilibrio, inicialmente en el proceso de la coagulación. El tiempo de

coagulación es variable, dependiendo de la cantidad de GDL que se añadirán en la solución, puede ocurrir en hasta 60 minutos

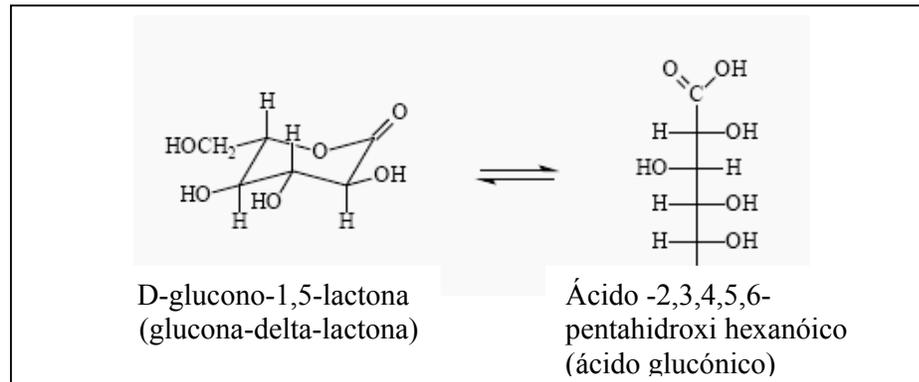


Figura 7: Reacción de hidrólisis en solución de la glucono-delta-lactona a ácido glucónico.

Fuente: ZAIGUI, Li; HONGZHUO, Tan. 2009. Traditional Chinese foods: production and research progress. Nova Science Publishers, Inc. 353 páginas. United States.

3.3.3.1. Metabolismo, biotransformación y cinética

La Glucono-delta-lactona, en un medio acuoso, forma fácilmente un equilibrio en la mezcla de la lactona y el ácido glucónico. Estos son intermedios en la oxidación de la glucosa a través del ciclo pentosa fosfato, que, aunque no la principal vía del metabolismo de la glucosa, es bien reconocida.

3.3.3.2. Toxicidad

Cuando tres hombres recibieron 10 g (167 mg / kg) de glucono-delta- lactona por vía oral en una solución al 10%, los importes recuperados en la orina en siete horas representaron 7.7-15% de la dosis. No se encontraron constituyentes patológicos en la orina. Cuando 5 g (84 mg/kg) fueron administrados por vía oral no se recuperaron en la orina. La mayor dosis administrada a un hombre fue de 30 g.

Se puede sin embargo estimar para el caso del hombre un ingesta diaria aceptable de 0-50 mg/kg de peso corporal. (CIABOTTI, 2007)

3.4. Conclusiones

La gelificación de la proteína de soya esta influenciada directamente por el calor y por la cantidad de sales de gelificación que actúan en dicho proceso. Si estas interacciones llevan a la conformación de una red tridimensional capaz de englobar moléculas de agua, entonces ocurrirá la formación del gel. Para alcanzar un equilibrio de fuerzas para constituir la red y de las fuerzas repulsivas para evitar el colapso de la red que son necesarios para la formación de gel se requerirá establecer una buena combinación de las variable temperatura, tiempo y porcentaje de sales de gelificación.

CAPITULO 4

CULTIVOS LÁCTICOS APLICABLES EN SOYA

4.1. Biosíntesis y papel fisiológico de los oligosacáridos de la rafinosa, principales azúcares de la soya

Los oligosacáridos son una fuente primaria de energía y sustratos para la síntesis de otros compuestos durante la germinación de las plantas. Los oligosacáridos de rafinosa son ampliamente encontrados en el reino vegetal en una variedad de semillas, en las cuales son componentes de los carbohidratos de reserva, siendo los segundos carbohidratos solubles más abundantes en las plantas. (MEJÍAS, et al, 2009)

Los oligosacáridos de la rafinosa son sintetizados durante la formación de las semillas, y son hidrolizados durante el proceso de germinación. La vía metabólica de los oligosacáridos de la rafinosa puede ser presentada de la siguiente forma:

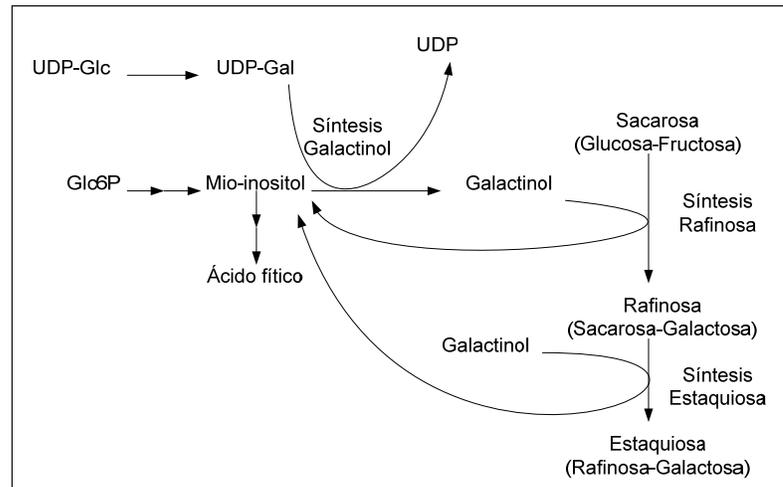


Figura 8: Síntesis de los oligosacáridos de la soya.

Fuente: RODRÍGUEZ, Ana. 2007. Validación bioquímica y nutricional de harina de soja procesada enzimáticamente para la remoción del oligosacárido rafinosa. Disertación grado de master en ciencias. Universidad de Vicosa. Brasil. Disponible en: <ftp://ftp.bbt.ufv.br/teses/bioquimica%20agricola/2007/202480f.pdf>

En donde UDP (uridina difosfato) – galactosa + mio-inositol → galactinol + UDP

Galactinol + sacarosa → rafinosa + mio-inositol

Galactinol + rafinosa → estaquiosa + mio-inositol

Galactinol + estaquiosa → verbacosa + mio-inositol

Galactinol + verbacosa → ajucosa + mio-inositol

“La enzima galactinol sintetasa (GS) (UDP- α D-gal: 1-Lmio-inositol-1-O- α -D-galactopiranosiltransferasa, cuyo código dentro de la clasificación enzimática es E.C. 2.4.1.123), que requiere Mn^{+2} para su actividad, cataliza la primera reacción en la vía de la síntesis de los oligosacáridos de la rafinosa, procediendo el galactinol a partir de UDP-galactosa y mio-inositol. La actividad de GS, en hojas y semillas, correlacionándose positivamente con los niveles de oligosacáridos de la rafinosa y esta enzima parece regular los niveles de oligosacáridos de reserva en partes específicas de la planta. Subsecuentemente de la primera reacción, sintetetasas específicas catalizan la síntesis de cada oligosacárido de la serie por medio de la transferencia de galactinol para la sacarosa, la rafinosa, la estaquiosa y la verbacosa, con la producción de α -1,6-galactosidasa, tri, tetra, penta y hexasacaridos de rafinosa” (RODRIGUEZ, 2007, 15....). (WHITAKER, et al, 2003)

4.2. Oligosacáridos de rafinosa y disturbios intestinales:

La ingestión de soya y sus productos derivados puede resultar en flatulencia, nauseas, dolor abdominal y diarrea, debido al alto contenido de rafinosa.

Esto ocurre, pues la mucosa del intestino delgado de los humanos y de los animales monogástricos esta desprovista de las enzimas α -1,6-galactosidasas necesarias para la conversión de los oligosacáridos de la rafinosa en azúcares más simples.

Así 100% de los Oligosacáridos de la rafinosa no sufren degradación y son conducidos a la parte posterior del intestino, donde son fermentados por bacterias anaeróbicas con una gran liberación de CO_2 , H_2 y CH_4 fenómeno conocido como flatulencia intestinal y que esta asociado como cólicos, diarrea, dispepsia y constipación. (CIABOTTI, 2007)

Varios estudios sugieren que la conversión enzimática de los oligosacáridos de la rafinosa presentes en el extracto hidrosoluble de soya y otros derivados parece ser la estrategia más eficaz para reducir los oligosacáridos de la rafinosa (O.R.).

Experimentos realizados, principalmente con animales monogástricos demostraron que el uso de α -galactosidasa en dietas basadas en soya mejora la ganancia de peso, la digestibilidad de las proteínas y disminuye las flatulencias.

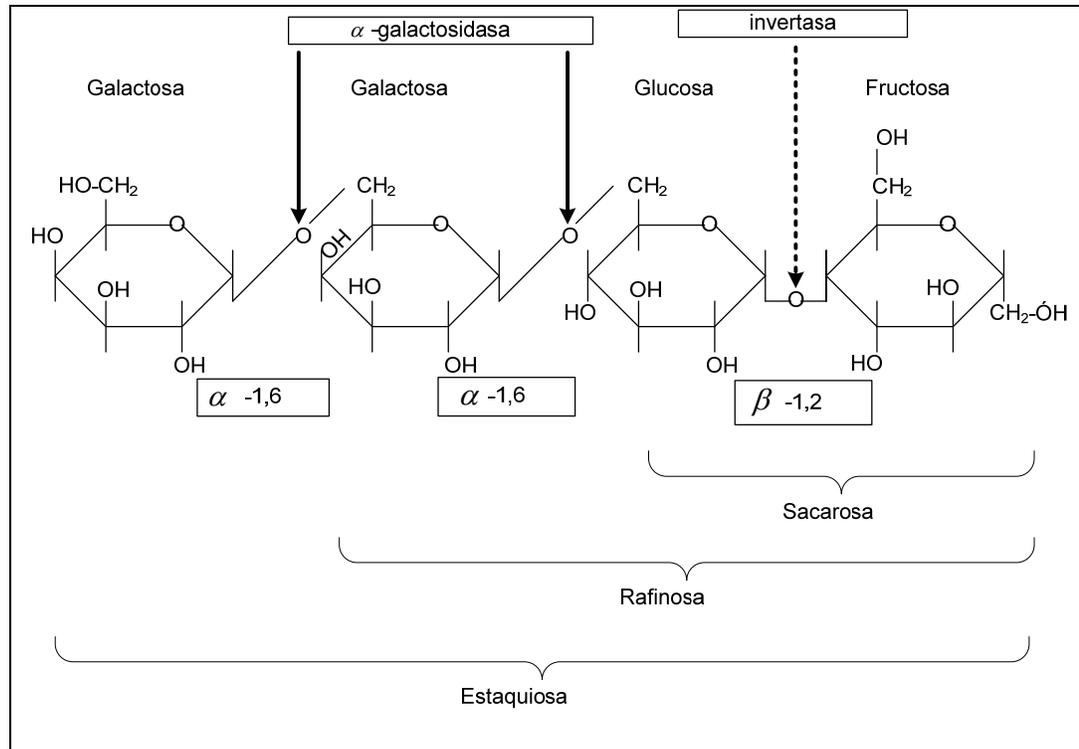


Figura 9: Hidrólisis de los oligosacáridos.

Fuente: RODRÍGUEZ, Ana. 2007. Validación bioquímica y nutricional de harina de soya procesada enzimáticamente para la remoción del oligosacárido rafinosa. Disertación grado de master en ciencias. Universidad de Vicosa. Brasil. Disponible en: <ftp://ftp.bbt.ufv.br/teses/bioquimica%20agricola/2007/202480f.pdf>.

Procesos para el tratamiento enzimático de leche de soya utilizando α -galactosidasas fúngicas fueron propuestos por Sugimoto e Vauren (1970) (Citados por (RODRIGUEZ, 2007, 25...)). Que usaron preparaciones comerciales de α -galactosidasas de *Aspergillus saltol* y verificaron la hidrólisis de esos azúcares después de 3 horas de incubación con la enzima. Thananunkul et al (1976) citados por (RODRIGUEZ, 2007), utilizaron micelios de *Motierella vinacea* inmovilizadas en gel de policrilamida como fuente de α -galactosidasas para la remoción de los oligosacáridos de rafinosa de leche de soya. Posteriormente Mulimani et al (1995) (citados por RODRIGUEZ, 2007)., validaron la capacidad de hidrólisis de los O.R.

de leche de soya por la α -galactosidasas de *Gibberella fujikuroi*. El efecto de las α -galactosidasas extracelulares producidas por *Lactobacillus plantarum* en la calidad nutricional de leche de soya y derivados también fue validado por Sanni et al (1997).

Y Scalabrini et al (1998) (Citados por (RODRIGUEZ, 2007).), ellos testearon la fermentación de leche de soya por cepas de *Bifidobacterium* y validaron la capacidad de reducción de los RO.

Estudios sobre la utilización de α -galactosidasas de vegetales en la hidrólisis de los O.R. en productos derivados de soya, también han sido desarrollados. Cruz y Silva (1986) (citados por (RODRIGUEZ, 2007).) testearon la reducción de lo RO en leche de soya por la adicción de pequeñas proporciones de granos de soya germinados en la formulación del producto, más no observaron un decrecimiento sustancial de rafinosa y estaquiosa.

4.3. Las bifidobacterias

4.3.1. Morfología

(TEUBER y GEIS, 2006) Las bacterias del género *Bifidobacterium* presentan una forma bacilar, muestran manchas grampositivas, son inmóviles y no esporuladas.

Varios componentes del medio pueden influir en la forma de estas bacterias:

- La concentración de N-acetilglucosamina, que participan en la síntesis de peptidoglicano, afecta a la forma de esta bacteria.
- Varios aminoácidos (alanina, ácido aspártico, ácido glutámico y serina) Iones Ca^{2+} .
- Los niveles bajos de N-acetilglucosamina y aminoácidos, configuran la más ramificada de las formas. Por el contrario, en un medio favorable los bacilos son más largos. ralladas

4.3.2. Fisiología

4.3.2.1. Tipo de respiración

Las *bifidobacterias* son microorganismos anaerobios estrictos. Sin embargo, el grado de tolerancia de oxígeno depende de la especie y el medio de cultivo.

4.3.2.2. Temperatura y pH

La temperatura óptima para el desarrollo de la especie humana esta entre los 36 y 38°C. Por el contrario, para la especie animal es ligeramente mayor, alrededor del 41 y 43°C e incluso pueden llegar a 46.58°C. No hay crecimiento por debajo del 20,8°C, y las bacterias de este tipo no tienen termorresistencia por encima de 46,8°C. Los bifidus mueren a 60,8°C. El pH inicial óptimo de crecimiento esta entre 6,5 y 7,0. Ningún crecimiento puede ocurrir por debajo de 5,0 o por encima de 8,0. (TEUBER y GEIS, 2006).

4.3.3. Metabolismo

4.3.3.1. Metabolismo del azúcar

En el género *Bifidobacterium* las hexosas se degradan exclusiva y específicamente por el vía de la fructosa-6-fosfato. La aldolasa y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa están ausentes, mientras que la fosfoquetalosa fructosa-6-fosfato se encuentra.

4.3.3.1.1. Metabolitos

La fermentación de dos moles de glucosa produce tres moles de acetato y dos moles de lactato. En realidad, el ácido pirúvico se puede desglosar en dos vías: la primera es la reducción del piruvato para formar L (+)-lactato por L (+)- lactato deshidrogenasa (EC 1.1.1.27), una enzima controlada por la fructosa-1,6-difosfato.

La segunda vía consiste en la división de la enzima piruvato por la enzima fosforoclastica para formar ácido fórmico y acetyl fosfato, una parte de la cual se reduce posteriormente para formar alcohol etílico para así regenerar NAD.

Las proporciones de los productos de la fermentación final varían considerablemente de una cepa a otra e incluso dentro de la misma especie. Las pequeñas cantidades de ácido succínico producidas por algunas cepas, y una pequeña cantidad de CO₂ puede producirse durante la degradación de gluconato. (SALMINEN, et al, 2004)

4.3.3.1.2. Las enzimas

Los productos de la fermentación final se forman por la acción secuencial de transaldolasas, transquetolasas, xilulosa-5-fosfato fosfoquetolasas, y las enzimas que pertenecen a la ruta de Embden-Meyerhoff-Parnas, que actúan en el gliceraldehído-3-fosfato. (SALMINEN, et al, 2004)

La enzima característica del metabolismo del azúcar por el género *Bifidobacterium* es la fosfoquetolasa fructosa-6-fosfato (F6PPK, EC 4.1.2.22). Esta enzima, que es específica para el género, está ausente en las bacterias anaerobias que podría ser confundidas morfológicamente con las *bifidobacterias*, es decir, *Lactobacillus*, *Arthrobacter*, *Propionibacterium*, *Corynebacterium* y *Actinomycetaceae*. Desjardins y Roy, utilizaron determinaron si 22 cepas de origen humano y animal poseen la α - y β -galactosidasa y actividad glucosidasa, la cual se resume en la siguiente tabla:

<i>B. bifidum</i>	D-Ribose	+	Sorbitol	+	Mannitol	+	Melibiose	+	Salicin	+
<i>B. longum</i>	D-Ribose	+	Sorbitol	+	Mannitol	+	Melibiose	+	Inulin	+
<i>B. infantis</i>	D-Ribose	+	Sorbitol	+	Mannitol	+	Melibiose	+	Inulin	+
<i>B. breve</i>	D-Ribose	+	Sorbitol	+	Mannitol	+	Melibiose	+	Inulin	+
<i>B. adolescentis</i>	D-Ribose	+	Sorbitol	+	Mannitol	+	Melibiose	+	Inulin	+
<i>B. angulatum</i>	D-Ribose	+	Sorbitol	+	Mannitol	+	Melibiose	+	Inulin	+
<i>B. catenulatum</i>	D-Ribose	+	Sorbitol	+	Mannitol	+	Melibiose	+	Inulin	+
<i>B. pseudocatenulatum</i>	D-Ribose	+	Sorbitol	+	Mannitol	+	Melibiose	+	Inulin	+
<i>B. dentium</i>	D-Ribose	+	Sorbitol	+	Mannitol	+	Melibiose	+	Inulin	+
<i>B. globosum</i>	D-Ribose	+	Sorbitol	+	Mannitol	+	Melibiose	+	Inulin	+
<i>B. pseudolongum</i>	D-Ribose	+	Sorbitol	+	Mannitol	+	Melibiose	+	Inulin	+
<i>B. cuniculi</i>	D-Ribose	+	Sorbitol	+	Mannitol	+	Melibiose	+	Inulin	+
<i>B. choerinum</i>	D-Ribose	+	Sorbitol	+	Mannitol	+	Melibiose	+	Inulin	+
<i>B. animalis</i>	D-Ribose	+	Sorbitol	+	Mannitol	+	Melibiose	+	Inulin	+
<i>B. thermophilum</i>	D-Ribose	+	Sorbitol	+	Mannitol	+	Melibiose	+	Inulin	+
<i>B. boum</i>	D-Ribose	+	Sorbitol	+	Mannitol	+	Melibiose	+	Inulin	+
<i>B. magnum</i>	D-Ribose	+	Sorbitol	+	Mannitol	+	Melibiose	+	Inulin	+
<i>B. pullorum</i>	D-Ribose	+	Sorbitol	+	Mannitol	+	Melibiose	+	Inulin	+
<i>B. suis</i>	D-Ribose	+	Sorbitol	+	Mannitol	+	Melibiose	+	Inulin	+
<i>B. minimum</i>	D-Ribose	+	Sorbitol	+	Mannitol	+	Melibiose	+	Inulin	+
<i>B. subtile</i>	D-Ribose	+	Sorbitol	+	Mannitol	+	Melibiose	+	Inulin	+
<i>B. coryneforme</i>	D-Ribose	+	Sorbitol	+	Mannitol	+	Melibiose	+	Inulin	+
<i>B. asteroides</i>	D-Ribose	+	Sorbitol	+	Mannitol	+	Melibiose	+	Inulin	+
<i>B. indicum</i>	D-Ribose	+	Sorbitol	+	Mannitol	+	Melibiose	+	Inulin	+
	L-Arabinose	+	Sorbitol	+	Mannitol	+	Melibiose	+	Inulin	+
	Lactate	+	Sorbitol	+	Mannitol	+	Melibiose	+	Inulin	+
	Cellulose	+	Sorbitol	+	Mannitol	+	Melibiose	+	Inulin	+
	Melzitose	+	Sorbitol	+	Mannitol	+	Melibiose	+	Inulin	+
	D-Ribose	+	Sorbitol	+	Mannitol	+	Melibiose	+	Inulin	+
	L-Arabinose	+	Sorbitol	+	Mannitol	+	Melibiose	+	Inulin	+
	Lactate	+	Sorbitol	+	Mannitol	+	Melibiose	+	Inulin	+
	Cellulose	+	Sorbitol	+	Mannitol	+	Melibiose	+	Inulin	+
	Melzitose	+	Sorbitol	+	Mannitol	+	Melibiose	+	Inulin	+
	Rafinose	+	Sorbitol	+	Mannitol	+	Melibiose	+	Inulin	+
	Sorbitol	+	Sorbitol	+	Mannitol	+	Melibiose	+	Inulin	+
	Sarch	+	Sorbitol	+	Mannitol	+	Melibiose	+	Inulin	+
	Gluconate	+	Sorbitol	+	Mannitol	+	Melibiose	+	Inulin	+
	Xylose	+	Sorbitol	+	Mannitol	+	Melibiose	+	Inulin	+
	Mannose	+	Sorbitol	+	Mannitol	+	Melibiose	+	Inulin	+
	Fructose	+	Sorbitol	+	Mannitol	+	Melibiose	+	Inulin	+
	Galactose	+	Sorbitol	+	Mannitol	+	Melibiose	+	Inulin	+
	Sucrose	+	Sorbitol	+	Mannitol	+	Melibiose	+	Inulin	+
	Mallose	+	Sorbitol	+	Mannitol	+	Melibiose	+	Inulin	+
	Trehalose	+	Sorbitol	+	Mannitol	+	Melibiose	+	Inulin	+
	Melibiose	+	Sorbitol	+	Mannitol	+	Melibiose	+	Inulin	+
	Mannitol	+	Sorbitol	+	Mannitol	+	Melibiose	+	Inulin	+
	Inulin	+	Sorbitol	+	Mannitol	+	Melibiose	+	Inulin	+
	Salicin	+	Sorbitol	+	Mannitol	+	Melibiose	+	Inulin	+

Figura 10: Actividad α -galactosidasa

Fuente: RODRÍGUEZ, Ana. 2007. Validación bioquímica y nutricional de harina de soja procesada enzimáticamente para la remoción del oligosacárido rafinosa. Disertación grado de master en ciencias. Universidad de Vicosá. Brasil. Disponible en: <ftp://ftp.bbt.ufv.br/teses/bioquimica%20agricola/2007/202480f.pdf>.

4.4. El genero lactococcus

4.4.1. Introducción

La importancia del *lactococcus* en el desarrollo de la microbiología básica, genética, biología molecular, la bioquímica microbiana y en general la ciencia de los alimentos, y la biotecnología ha sido muy importante.

Su uso a gran escala actual en la industria de fermentaciones, especialmente en la fabricación de productos lácteos tiene un significado particular. (SALMINEN, et al, 2004)

“Los primeros estudios del *lactococcus* fueron realizados por Joseph Lister en 1873, el cual estaba intentando probar la teoría germinal de Pasteur sobre los cambios fermentativos. En los experimentos de Lister con leche hervida como un medio nutritivo, obtuvo por casualidad el primer cultivo bacteriano puro de este genero. El contexto del manual realizado por Lister, según muchos autores, marca el amanecer de taxonomía bacteriana, donde el sugirió nombrarla a esta bacteria *Bacterium lactis*”. (TEUBER y GEIS, 2006, 253...)

4.4.2. Taxonomía

Esta bacteria fue posteriormente rebautizadas como *Streptococcus lactis* por Orla-Jensen en 1919. En base de nuevas investigaciones exhaustivas, Schleifer en 1985 propone el nuevo nombre de género "Lactococcus".

La posición del *lactococcus* dentro la rama del *clostridium* en el árbol filogenético de la evolución es mostrado en la siguiente Figura 11. El *lactococcus* están claramente separado de géneros los considerados patógenos del *estreptococcus*.

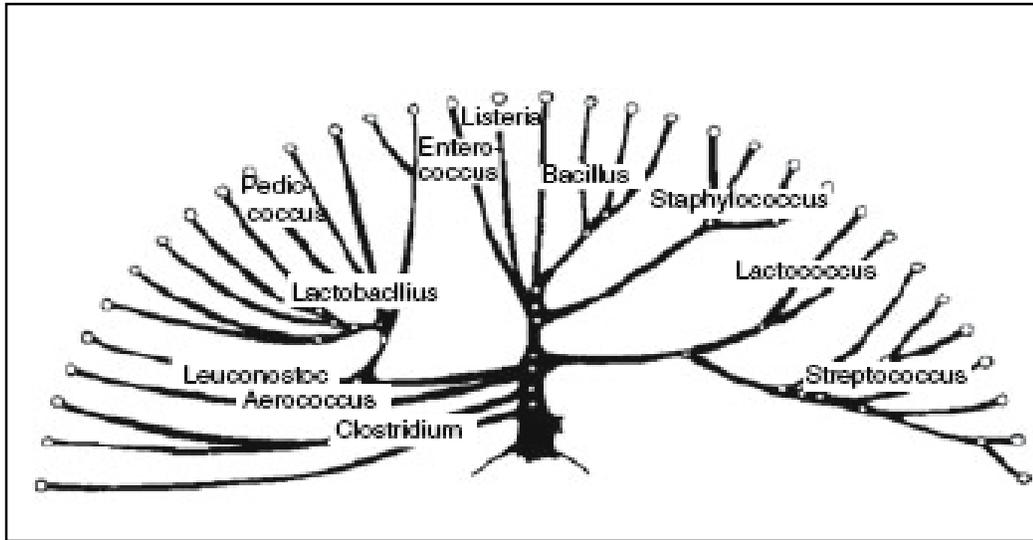


Figura 11: Tronco de separación de la familia Lactococcus.

Fuente: TEUBER M., GEIS A. 2006. The Genus Lactococcus, The Prokaryotes A Handbook on the Biology of Bacteria Volume 4: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria. 3era Edición. Editorial Springer. 1182 pag. United States.

La taxonomía molecular del lactococcus dio paso a la detección y diferenciación de nuevas especies, además del *Lactococcus lactis*: *L. garviae*, *L. raffinolactis*, *L. plantarum* y *L. piscium*. El *Lactococcus garviae* ha sido identificado como un agente causal de la mastitis bovina y lactococcosis del pescado. En casos raros, el *L. lactis* se ha aislado de humanos en el tracto urinario e infecciones de heridas, y de pacientes con endocarditis. En este comportamiento, se parece a otras bacterias del ácido láctico.

4.4.3. Hábitat

El *lactococcus* comprende las especies *Lactococcus lactis*, *L. garviae.*, *L. plantarum*, *L. piscium* y *L. raffinolactis*. *Lactococcus lactis subsp. lactis* y *L. lactis biovar "diacetylactis"*. Según Schleifer en 1985, estableció que el estado *subespecífico de L. lactis subsp. "diacetylactis"* ya no es válido debido a la importancia del *lactococcus diacetil* de formación, especialmente en fermentación láctea donde la distinción entre *L. lactis subsp. lactis* y *L. lactis biovar "diacetylactis"* es más práctico y preferido, han sido detectadas directamente o como consecuencia de enriquecimiento en material vegetal, incluyendo el maíz fresco y congelado, en frijol

blanco, repollo, lechuga, granos de soya, guisantes, salvado de trigo, hierba, trébol, papas, pepinos y melones. (TEUBER y GEIS, 2006)

4.5. El genero leuconostoc.

4.5.1. Introducción

El género *Leuconostoc* una típica bacteria ácido láctica geno y fenotípicamente se asemejan más a los géneros *Lactobacillus* género en que son Gram-positivos, catalasa-negativos y anaerobios facultativos. (COCIO, 2006)

El *Leuconostoc paramesenteroides* ha demostrado que forma un grupo filogenético natural con los ex lactobacilos *Lactobacillus confusus*, *Lactobacillus halotolerans*, *Lactobacillus kandleri*, *Lactobacillus minor* y *Lactobacillus viridescens*, sobre la base de estudios sobre su secuencia genética.

En la actualidad, el género *Leuconostoc* comprende 10 especies: *L. pseudomesenteroides*, *L. argentinum*, *L. carnosum*, *L. citreum*, *L. gasicomitatum*, *L. gelidum*, *L. kimchii*, *L. lactis*, y 3 subespecies reconocidas de *Leuconostoc mesenteroides*: *L. mesenteroide*, *L. cremoris*, *L. dextranicum* (TEUBER y GEIS, 2006)..

4.5.2. Habitats

Los *leuconostocs* son exigentes en sus requerimientos de nutrientes, y en compartir con numerosos habitats naturales y artificiales (especialmente sustratos de alimentos) con otros LAB, y en particular con los *lactobacilos*, *pediococcus* y *carnobacteria*. Los factores de crecimiento, como aminoácidos y péptidos, hidratos de carbono fermentables, ácidos grasos, ácidos nucleicos y vitaminas en particular, apoyan a sus requerimientos nutricionales. (MEJÍAS, et al, 2009).

Prácticamente todas las cepas parecen requerir de la biotina, nicotina, tiamina y ácido pantoténico o sus derivados.

La generación de energía es mediante la fermentación de hidratos de carbono a través tanto de la hexosa-monofosfato y de las vías fosfoquetolasa, en combinación con la fosforilación a nivel sustrato. Los productos finales de la fermentación de la glucosa son el CO₂, etanol y/o acetato, y, o bien D (-)-lactato

4.5.3. El género en otros hábitos alimenticios

El género *Leuconostoc* también se puede encontrar en otros hábitats alimenticios. De 400 aislamientos láctico estudiados por Stirling y Whittenbury en 1963, el 80% fueron *leuconostocs*, 10% *pediococci*, y el resto *lactobacilos*. En los vegetales como los guisantes y frijoles preparados para la congelación, los *Leuconostocs mesenteroides subsp. mesenteroides* pueden multiplicarse y causar acidez, decoloración o mal sabor. (SALMINEN, et al, 2004). El *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides* dominó entre los aislamientos de LAB responsables del deterioro de productos frescos listos para el uso de zanahorias ralladas (TEUBER y GEIS, 2006).

De igual forma en productos de Soya. Una cepa de *L. mesenteroides subsp. mesenteroides*, que se encontraba provocando defectos en queso de soya, fue aislado en una placa de agar de leche de soya a 5°C en condiciones anaerobias.

4.5.4. Condiciones generales de crecimiento

La mayoría de *leuconostocs* son relativamente insensibles al oxígeno, aunque el crecimiento más prolífico se observa a menudo en ambientes reducidos. Especialmente para el aislamiento de *leuconostocs* de las carnes empacadas al vacío, Las mezclas de gases de N₂, H₂, CO₂ o "equipos anaeróbicos de producción de gas, establecen condiciones más favorables para el crecimiento superficial de la colonia. Las temperaturas de incubación pueden estar entre 20 y 25°C.

4.5.5. Fermentación de carbohidratos

Sólo el *L. mesenteroides subsp. cremoris* pueden distinguirse fácilmente de los otros *leuconostocs* debido a su poca capacidad de fermentación de hidratos de carbono. Este solo fermenta la glucosa, galactosa y lactosa. En cambio el resto especies de *Leuconostoc* pueden perfectamente fermentar la arabinosa, melibiosa, trehalosa y xilosa.

4.6. Conclusiones

El conocimiento sobre la taxonomía bacteriana permite descubrir que las bacterias conocidas como LAB no solo fermentan la lactosa ya que además producen diversas enzimas capaces de fermentar otros azúcares presentes en medios alimenticios como la soya.

CAPITULO 5

DISEÑO EXPERIMENTAL

5.1 Introducción

El diseño de experimentos permite optimizar la información generada acerca de un proceso, en relación a los objetivos planteados. En otras palabras, el diseño experimental es la aplicación de métodos científicos para generar conocimiento acerca de un sistema o proceso. Esta herramienta se ha ido consolidando en la industria actual como un conjunto de técnicas estadísticas y de ingeniería, que permiten lograr la máxima eficacia de los procesos con el mínimo costo. El diseño de experimentos es especialmente útil para crear calidad desde la fase de diseño del producto y del proceso; pero también permite lograr mejoras sustanciales en procesos ya establecidos (GUTIÉRREZ y DE LA VARA, 2008).

5.2. Generalidades del diseño experimental

El diseño experimental es una técnica científica que nos ayuda a realizar una planificación y análisis de experimentos para obtener información de calidad. Esta información nos permitirá comprobar hipótesis científicas, desarrollar nuevos productos y procesos, comprender de mejor manera un sistema (un procedimiento analítico, un proceso industrial, etc.) y tomar decisiones sobre como optimizarlo y mejorar su calidad, etc. Evidentemente que la experimentación debe ser planificada cuidadosamente para que proporcione la información buscada. Ejemplos de sistemas experimentales son:

- Una reacción química, cuyo rendimiento (Y) puede ser función, entre otros, del tiempo de reacción (X_1), la temperatura de la reacción (X_2) y el tipo de catalizador (X_3) utilizado. Otras variables que pueden influir son, por ejemplo, la pureza de los reactivos, la limpieza del material, la velocidad de agitación, etc.
- Una separación cromatográfica, donde el tiempo de la separación depende del pH y el porcentaje de modificador orgánico de la fase móvil.

- Un alimento, que generalmente se produce por mezcla en distintas proporciones (X) de sus ingredientes, lo cual da lugar a diferentes caracteres organolépticos (Y).

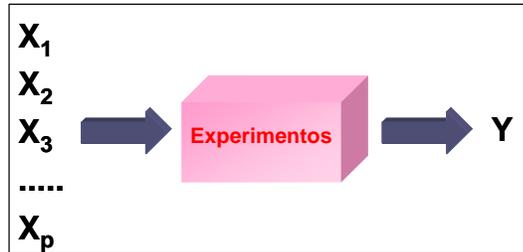


Figura 12. Factores, experimentos y respuesta experimental

Fuente: TODESCHINI, Roberto; CONSONNI, Viviana y PAVAN, Manuela. 2006. La metodología della ricerca sperimentale. Milano Chemometrics and Research Group. 213 páginas. Italia.

5.3. Objetivos del diseño experimental

Tanto por la importancia de las decisiones que se pueden tomar, como por el coste elevado de la experimentación no es adecuado dejar la elección de los experimentos y la evaluación de sus resultados a la mera intuición del experimentador. Es más razonable utilizar una metodología matemática y estadística que indique como planificar (diseñar, organizar) la secuencia de experimentos de una forma óptima, de manera que se minimice el coste de la experimentación y la influencia del error experimental sobre la información buscada. Dicha planificación y análisis es el principal objetivo del Diseño Estadístico de Experimentos. Además, persigue otros objetivos como:

- Obtener un conocimiento inicial sobre un nuevo sistema en estudio. ¿En qué valores de los factores se puede centrar la investigación?.
- Determinar la influencia de los factores sobre las respuestas observadas. De entre todos los factores que afectan al proceso, ¿cuales influyen más?, ¿cómo interaccionan entre ellos?.
- Optimizar respuestas. ¿Qué valores de los factores proporcionan las respuestas de mayor calidad?.

- Determinar la robustez del sistema. ¿Como afectan a la respuesta variaciones no controladas en el valor de los factores?

5.4. Ventajas del diseño experimental.

1. Elimina el efecto producto de las variables perturbadoras o extrañas, mediante el efecto de aleatorización.
2. El control y manipulación de las variables predictorias clarifican la dirección y naturaleza de la causa.
3. Flexibilidad, eficiencia, simetría y manipulación estadística.

5.5. Etapas de un diseño experimental

La metodología de la planificación experimental necesita de algunos pasos que finalizan en la solución del problema en estudio. Esta serie de pasos son necesarios pues de otra forma el problema podría no ser resuelto o bien definido, en otras palabras, presentarse de tal forma que no sea factible una resolución científica eficiente. Los pasos fundamentales en los que se articula la metodología experimental para resolver un problema son:

1. Análisis del problema.
2. Planificación de los experimentos.
3. Ejecución de los experimentos.
4. Tratamiento estadístico de los datos y análisis de resultados.
5. Responder las preguntas planteadas, sea directamente o utilizando un modelo matemático. Si es necesario, regresar a la etapa inicial (1).

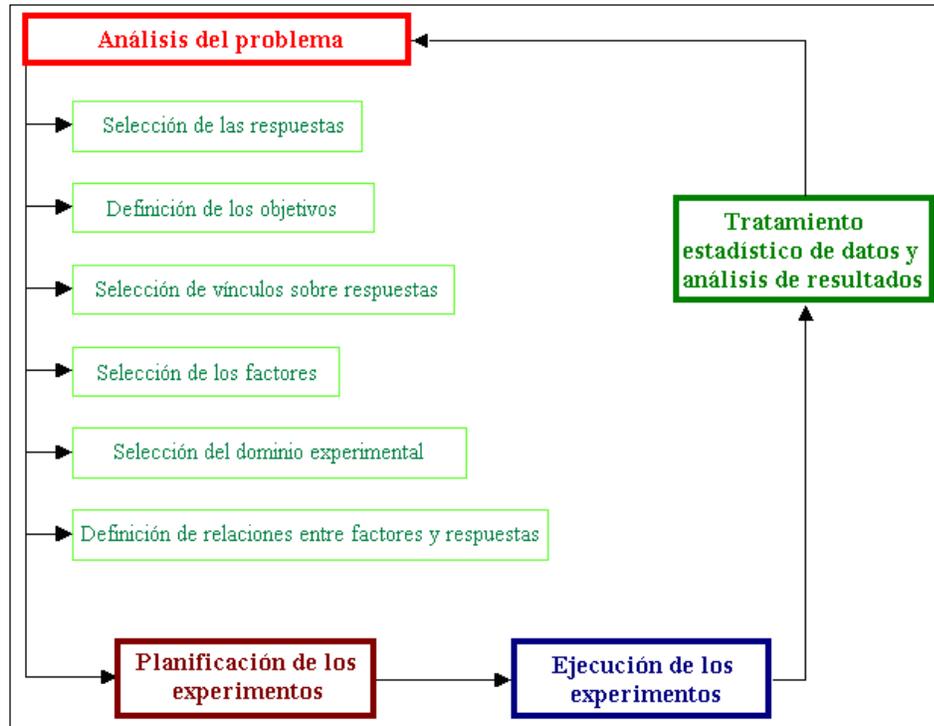


Figura 13. Ciclo de resolución de un diseño experimental

Fuente: TODESCHINI, Roberto; CONSONNI, Viviana y PAVAN, Manuela. 2006. La metodología della ricerca sperimentale. Milano Chemometrics and Research Group. 213 páginas. Italia.

5.5.1. Análisis del problema

Es el primer paso en el ciclo de resolución y consiste en un análisis detallado del contexto conceptual y científico en el que se ubica la actividad a desarrollar. Esta fase se desarrolla antes de efectuar los experimentos; o en otros casos, a la luz de información que proviene de experimentos iniciales. En esta fase será importante tanto la contribución de expertos y no expertos, puesto que éstos últimos permitirán evidenciar aspectos que pueden estar en segundo plano. En esta etapa se debe desarrollar diversos pasos:

1. Definir de la función respuesta.
2. Establecer los objetivos.
3. Definir los vínculos sobre la respuesta.
4. Analizar el sistema estudiado
5. Definir el dominio experimental.

6. Establecer las hipótesis sobre las relaciones entre respuestas y factores.

Como consecuencia del análisis del problema debe surgir una definición clara del objetivo del trabajo. En muchos casos, este objetivo es en realidad una función multirespuesta, en el sentido que el objetivo final consiste en alcanzar las mejores condiciones que satisfacen contemporáneamente todos los objetivos parciales definidos.

5.5.2. Planificación de los experimentos

Esta etapa es la verdadera y propia fase en el cual se definen los experimentos que se tienen que realizar. Se trata entonces de elaborar una lista de los experimentos a desarrollar en el laboratorio, especificando el valor que cada factor en estudio debe tener en cada experimento, con la finalidad de medir una respuesta experimental en las condiciones establecidas de los factores, es decir en las condiciones experimentales establecidas.

Para planificar los experimentos existen varias técnicas, que han sido consolidadas sus características por matemáticos-estadísticos que garantizan la calidad de la experimentación. La selección de la técnica entre las varias disponibles depende del problema, del objetivo o del tipo de factores a estudiar.

La planificación de los experimentos tiene una importancia crucial para conseguir los objetivos de la investigación. Esto indica, que si la proyección de los experimentos es efectuada a caso o de forma no adecuada, la información obtenida no será suficiente para alcanzar el objetivo, o en términos matemáticos, los coeficientes de regresión del modelo tendrán una incertidumbre grande, lo que no permitirá que el modelo no sea útil, ni permita encontrar las condiciones de optimalidad.

Tabla 5. Número de experimentos para n niveles y k factores

Factores	Niveles					
	2	3	4	5	6	7
2	4	9	16	25	36	49
3	8	27	64	125	216	343
4	16	81	256	625	1296	2401
5	32	243	1024	3125	7776	16807
6	64	729	4096	15625	46656	117649
7	128	2187	16384	78125	279936	823543
8	256	6561	65536	390625	1679616	5764801
9	512	19683	262144	1953125	10077696	
10	1024	59049	1048576	9765625	60466176	

Fuente: Autor

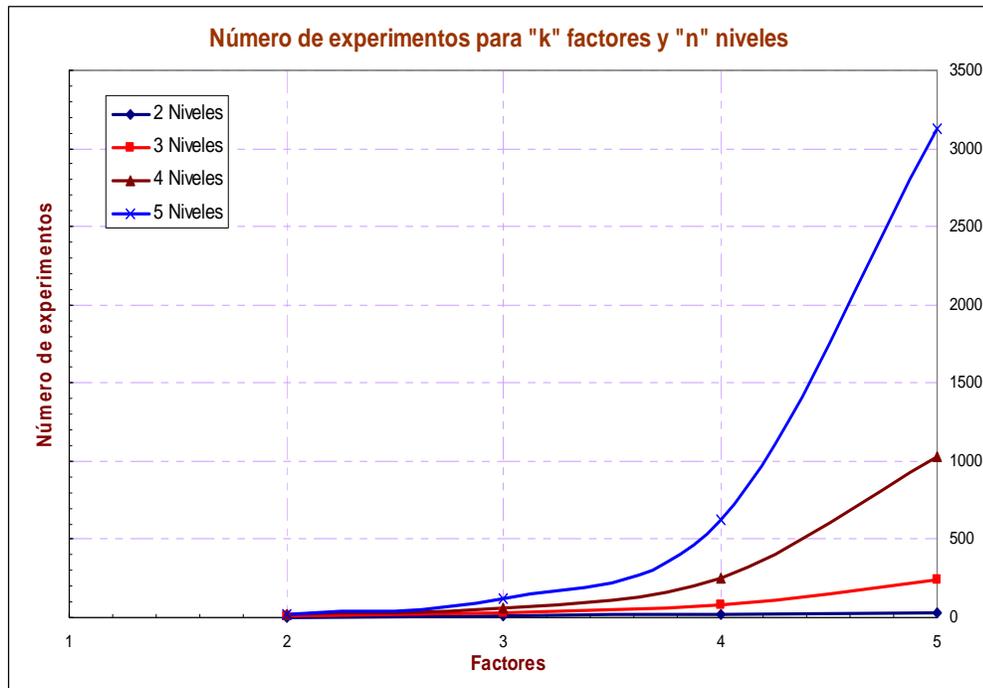


Figura 14. Número de experimentos para n niveles y k factores

Fuente: Autor

5.5.3. Ejecución de los experimentos

Esta fase consiste en la realización efectiva de los experimentos planificados. En la ejecución de los experimentos es absolutamente necesario atenerse a los procedimientos estándares, de tal forma de evitar que la variación relevante de la medida experimental dependa también de cómo el experimentador ha procedido al

momento de efectuarla. El objetivo de un procedimiento estandarizado es el de reducir el error experimental y obtener la máxima repetibilidad y reproducibilidad; para tal efecto es importante randomizar los experimentos de la lista de planificación.

5.5.4. Tratamiento estadístico de los datos y análisis de resultados

En el diseño experimental, el tratamiento de los datos consiste en utilizar los métodos de regresión, con referencia particular a la regresión de mínimos cuadrados multivariantes (*Ordinary Least Squares, OLS* o *Multiple Linear Regresión, MLR*). En este contexto, los métodos de regresión permiten calcular los coeficientes de regresión de una relación (sea lineal o cuadrática) entre la respuesta o respuestas experimentales y los factores en estudio, utilizando los valores obtenidos de las medidas experimentales realizadas.

El análisis estadístico de resultados obtenido del modelo de regresión permite a través de los coeficientes de las variables, obtener toda la información necesaria para evaluar la importancia de los factores en el modelamiento del sistema. El papel de los coeficientes de regresión tiene una importancia relevante en la primera fase del trabajo (etapa de screening) por cuanto permite seleccionar los factores realmente significativos para la respuesta experimental estudiada, y poder eliminar definitivamente los factores poco influyentes sobre la misma respuesta.

5.6. Escalado de las variables

Los factores que definen las condiciones experimentales son variables definidas en sus unidades de medida en base a la selección del experimentador. Así, una temperatura podrá ser definida en grados centígrados o grados kelvin, una concentración en porcentaje o partes por millón, o cualquier otra unidad de medida de concentración.

De esta manera, los números que representan cada variable serán diversos y dependerán de la unidad de medida y de la escala preestablecida. Los parámetros estadísticos calculados para cada variable dependerán también de la unidad de medida y entonces serán útiles para realizar comparaciones entre variables.

Por esta razón, muchos métodos estadísticos requieren que las variables sean representadas en escala que entre ellas sean homogéneas para consentir una comparación de las variables mismas y tengan igual importancia a priori en el análisis realizado. Una de las razones por las que se recurre al escalado de las variables de los factores en el diseño experimental es justamente para proporcionar homogeneidad en los coeficientes del modelo vinculados de los factores y de los intervalos de variación para cada uno.

El escalado de las variables independientes se realiza para evitar el efecto preponderante de aquellas variables descritas con números muy grandes. En la regresión univariante no existe este problema, pero en la regresión multivariante es un problema muy difundido.

En el diseño factorial se aplica un escalado de rango, es decir todas las variables naturales se transforman en variables codificadas con una variación homogénea, aplicando la siguiente fórmula:

$$X' = 2 \frac{X - X_{MIN}}{X_{MAX} - X_{MIN}} - 1$$

$$-1 \leq X' \leq +1$$

$$X_{MAX} = \text{valor máximo de cada variable} \quad X' = +1$$

$$X_{MIN} = \text{Valor mínimo de cada variable} \quad X' = -1$$

Este tipo de escalado de variables permite una mayor facilidad de interpretación de los factores, debido a que el coeficiente calculado del modelo está directamente relacionado con la importancia de los factores. La información obtenida no tiene influencia con la unidad de medida con que se expresa las diferentes variables.

5.7. Diseño factorial a dos niveles y “k” factores

Un diseño experimental común es en el que todas las variables de entrada se ponen a dos niveles cada una. Estos niveles se llaman “Alto” y “Bajo” o “+1” y “-1”, respectivamente. Un diseño con todas las posibles combinaciones de las variables de

entrada en los niveles alto/bajo se denomina un plan o diseño experimental factorial completo a dos niveles.

Si tenemos k factores, cada uno colocado a 2 niveles, un diseño experimental factorial completo tiene 2^k experimentos.

Tabla 6. Matriz del diseño a dos niveles para 1, 2, 3 y 4 variables

n. exp.	x ₁	x ₂	x ₃	x ₄
1	-	-	-	-
2	+	-	-	-
3	-	+	-	-
4	+	+	-	-
5	-	-	+	-
6	+	-	+	-
7	-	+	+	-
8	+	+	+	-
9	-	-	-	+
10	+	-	-	+
11	-	+	-	+
12	+	+	-	+
13	-	-	+	+
14	+	-	+	+
15	-	+	+	+
16	+	+	+	+

Fuente: Autor

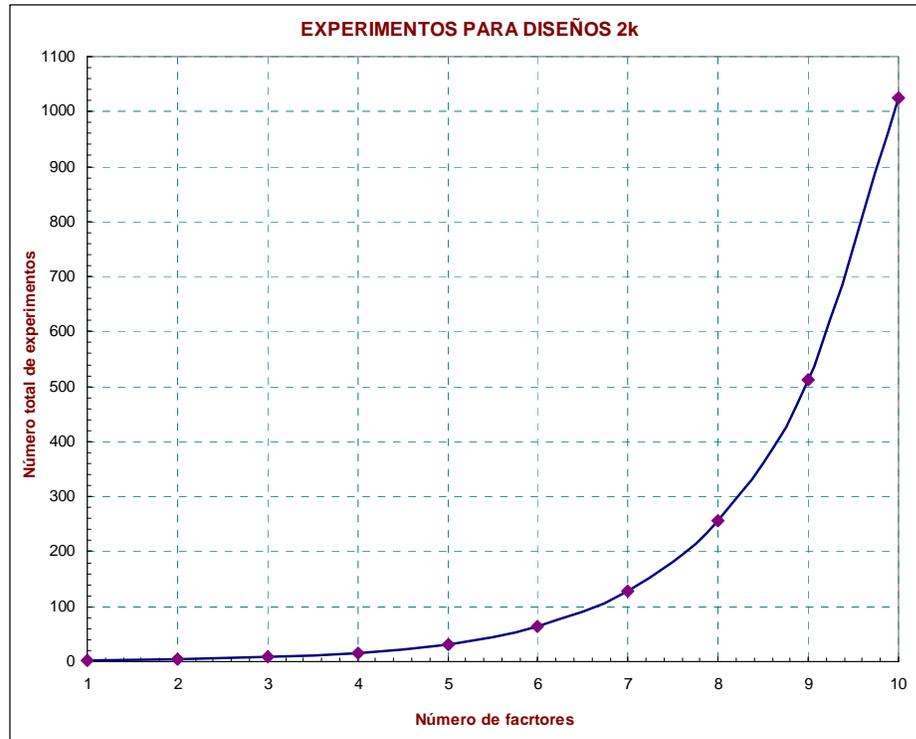


Figura 15. Experimentos para un diseño factorial a dos niveles y k factores

Fuente: Autor

Como se muestra en la tabla anterior, cuando el número de factores es igual o mayor a 5, un diseño factorial completo requiere un elevado número de experimentos. En estos casos se recomienda la utilización de técnicas experimentales, tales como: diseños factorial fraccionarios (CARLSON y CARLSON, 1992) o diseños de Plackett-Burman (LEWIS, et al, 1999).

5.7.1. Descripción

Considerando el diseño experimental factorial completo a dos niveles para tres factores, es decir un plan experimental 2^3 ; esto implica ocho experimentos (sin contar las réplicas al punto cero). Gráficamente podemos representar este diseño 2^3 por el cubo mostrado en Figura 3.5. La dirección de las flechas muestra la dirección de aumento de los factores. Los números de las esquinas de referencia del cubo de plan muestran el orden normal de los experimentos.

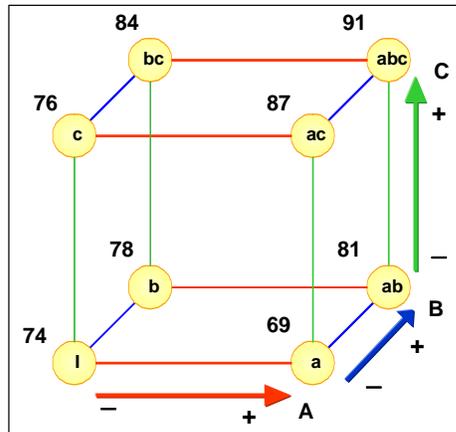


Figura 16. Representación de un diseño factorial completo a dos niveles y tres factores

Fuente: TODESCHINI, Roberto; CONSONNI, Viviana y PAVAN, Manuela. 2006. La metodología della ricerca sperimentale. Milano Chemometrics and Research Group. 213 páginas. Italia.

Un diseño factorial completo a 2 niveles y 3 factores tiene la siguiente matriz del modelo en la forma tabular, la cual viene derivada del grafico anterior:

Tabla 7. Matriz del diseño para dos niveles y 3 factores

Exp	X ₁	X ₂	X ₃	Y
1	-1	-1	-1	Y ₁
2	1	-1	-1	Y ₂
3	-1	1	-1	Y ₃
4	1	1	-1	Y ₄
5	-1	-1	1	Y ₅
6	1	-1	1	Y ₆
7	-1	1	1	Y ₇
8	1	1	1	Y ₈

Fuente: Autor

De la matriz del diseño se construye la matriz del modelo, en la cual se adicionan columnas, donde se colocan la intercepa, las interacciones de dos, tres o *n* número de variables independientes que están siendo estudiadas:

Tabla 8. Matriz del modelo para dos niveles y 3 factores

Exp	I	X ₁	X ₂	X ₃	X ₁ X ₂	X ₁ X ₃	X ₂ X ₃	X ₁ X ₂ X ₃	Y
1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	Y ₁
2	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	Y ₂
3	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	Y ₃
4	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	Y ₄
5	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	Y ₅
6	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	Y ₆
7	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	Y ₇
8	1	1	1	1	1	1	1	1	Y ₈

Fuente: Autor

5.8. Cálculo del modelo de regresión

Una vez ejecutados los experimentos y medidas la o las respuestas, se tiene que calcular el modelo que brinda la información necesaria para la tomas de decisiones. Se utiliza entonces la matriz del diseño (X) y el vector respuestas (Y).

$$Y = X \cdot b + e$$

en forma matricial:

$$\begin{bmatrix} Y_1 \\ Y_2 \\ Y_3 \\ Y_4 \\ Y_5 \\ Y_6 \\ Y_7 \\ Y_8 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} +1 & -1 & -1 & -1 & +1 & +1 & +1 & -1 \\ +1 & +1 & -1 & -1 & -1 & -1 & +1 & +1 \\ +1 & -1 & +1 & -1 & -1 & +1 & -1 & +1 \\ +1 & +1 & +1 & -1 & +1 & -1 & -1 & -1 \\ +1 & -1 & -1 & +1 & +1 & -1 & -1 & +1 \\ +1 & +1 & -1 & +1 & -1 & +1 & -1 & -1 \\ +1 & -1 & +1 & +1 & -1 & -1 & +1 & -1 \\ +1 & +1 & +1 & +1 & +1 & +1 & +1 & +1 \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} b_0 \\ b_1 \\ b_2 \\ b_3 \\ b_{12} \\ b_{13} \\ b_{23} \\ b_{123} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e_1 \\ e_2 \\ e_3 \\ e_4 \\ e_5 \\ e_6 \\ e_7 \\ e_8 \end{bmatrix}$$

El cálculo de los efectos puede efectuarse mediante diferentes algoritmos. Se presentará a continuación el método de regresión de mínimos cuadrados ordinarios (*Ordinary Least Squares, OLS*) (DRAPER y SMITH, 1981).

$$b = (X^T \cdot X)^{-1} \cdot X^T \cdot Y$$

La expresión $(X^T X)^{-1}$ se conoce como la matriz de dispersión, la cual proporciona información acerca del error de los coeficientes a priori, es decir, de planificación experimental. El diseño factorial tiene la ventaja que presenta los errores más bajos de planificación, respecto a otros métodos que existen.

$$(X^T X)^{-1} = \begin{bmatrix} 1/8 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1/8 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1/8 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1/8 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 1/8 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1/8 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1/8 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1/8 \end{bmatrix}$$

La matriz de dispersión, contiene a lo largo de la diagonal los coeficientes multiplicativos que, multiplicados por el error experimental proporcionan el valor de la varianza de los coeficientes del modelo. Como se puede observar, en el caso de los diseños factoriales, la contribución a la incertidumbre de los coeficientes causados de cómo se ejecutan los experimentos es igual para todos los factores y las interacciones, y vale $1/n$, donde n es el número de experimentos. Los elementos fuera de la diagonal son los coeficientes multiplicativos del error experimental para el cálculo de la covarianza entre los coeficientes de factores diversos. Esta característica extremadamente importante de los diseños factoriales está ligada a la ortogonalidad de los factores y de las interacciones. De esta forma, utilizando los diseños factoriales la incertidumbre sobre los coeficientes es la misma para todos los coeficientes y la mínima posible.

5.9. Determinación de los efectos significativos

Una vez calculados los efectos de los factores, el objetivo fundamental se convierte en evaluar cuáles son los efectos relevantes para la respuesta y también cuáles pueden ser razonablemente considerados como no influyentes. En otras palabras, esto significa definir que factores o interacciones contribuyen a modelar la función respuesta. Utilizando las variables o interacciones significativas se puede construir

sucesivamente un modelo matemático que será en grado de explicar la función respuesta.

Este objetivo se lo puede conseguir mediante la comparación del error experimental y el error sobre el cálculo de los efectos. En ausencia de una evaluación del error experimental, se puede estimar los factores que son diversos de cero, utilizando los gráficos de probabilidad normalizada (normal probability plots) o el método de Lenth (LEWIS, et al, 1999).

5.9.1. Error experimental

El error experimental (MASSART, et al, 1997) es una cantidad que juega un rol extremadamente relevante en todas las metodologías de investigación experimental. A más de su significado intrínseco que va de la mano a la precisión de las medidas experimentales, entre las diversas expresiones que definen la calidad de la experimentación, se tiene: el cálculo de los intervalos de confianza de los coeficientes de regresión y de las respuestas calculadas por un modelo de regresión. El primer aspecto resulta fundamental en la fase inicial de la planificación (screening) donde el objetivo principal es evaluar la relevancia o no de los factores inicialmente tomados en consideración con un número pequeño de experimentos. Evidentemente todos los coeficientes de regresión relativos a los efectos no relevantes tendrán valores inferiores al error experimental.

La determinación de los efectos importantes puede ser realizada mediante una comparación del error sobre el cálculo del efecto calculado con el error experimental. Esta comparación sigue rigurosamente un camino estadístico mediante un test t de Student en el cual la distribución t de referencia tiene un número de grados de libertad pares al número de grados de libertad utilizados para el cálculo del error del efecto y de una varianza par a la varianza del mismo efecto. Operando de esta manera se puede definir el nivel de confianza deseado, si el valor de un efecto es significativamente diferente de cero.

Para el cálculo de la incertidumbre del efecto es necesario calcular el error experimental mediante réplicas de la misma medida (frecuentemente se realiza un

cierto número de réplicas de un experimento ubicado al centro del dominio experimental), o también con réplicas de experimentos diversos. El error experimental sobre la respuesta se podrá calcular a partir de réplicas de un mismo experimento. La varianza de las respuestas para el experimento replicado puede ser utilizada como estimadora del error experimental.

$$s^2 = \frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1}$$

La incertidumbre experimental “U exp” se calcula con una probabilidad de error de primer orden de $\alpha/2$ y grados de libertad (g.l.) igual a “n-1”.

$$U \exp\left(\frac{\alpha}{2}, g.l.\right) = t\left(\frac{\alpha}{2}, g.l.\right) \cdot \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Luego del cálculo de los efectos de los factores el paso siguiente es establecer cuales de estos son significativamente diferentes de CERO. Se lo realiza comparando el valor de los efectos de cada variable contra la incertidumbre experimental.

variable no significativa en el modelo experimental:

$$b_j < U \exp\left(\frac{\alpha}{2}, g.l.\right)$$

variable significativa en el modelo experimental:

$$b_j > U \exp\left(\frac{\alpha}{2}, g.l.\right)$$

5.9.2. Probability plots normal

Si se considera que la respuesta obtenida sea totalmente casual; es decir, que ningún factor influya en modo sistemático la respuesta medida, los efectos calculados resultarían distribuidos según una distribución normal centrada en el valor cero.

Los gráficos de probabilidad normal (Half-Normal Plot) (BOX, et al, 1978) se construyen modificando la escala de las ordenadas en modo que la curva sigmoide se transforme en una recta. Esto se obtiene reportando sobre las ordenadas, no la probabilidad porcentual, sino el valor de Z correspondiente a la probabilidad deseada, donde Z es la variable estandarizada de la función de distribución normal de probabilidad. Dado un cierto número de valores que se suponen tomados de una distribución normal, representándoles sobre este plano, se espera de encontrar alineamiento sobre una recta.

Se supone de tener 10 valores tomados de una población distribuida normalmente, inicialmente estos se deben ordenar de forma creciente. Sucesivamente se considera que siendo el número de objetos igual a 10 ($n=10$), se puede esperar que el primer elemento (el más pequeño) represente el primer 10% de la probabilidad acumulada. De hecho la probabilidad de obtener este valor es $1/10$ del total. Se puede entonces representar el primer intervalo del 10% de probabilidad asignando al punto intermedio de este intervalo (es decir el 5%) el valor del primer elemento. En modo similar se opera para el segundo elemento que se puede considerar representado del segundo intervalo del 10%, su probabilidad es el 20% y su valor puede ser representado en el punto correspondiente al 15%. En general, la probabilidad asociada al i -ésimo efecto (según el orden creciente) es:

$$p_i = \frac{100\%(i - 0,5)}{p}$$

Donde p es el número total de efectos calculados, excluido la media.

Si los valores obtenidos pertenecen a una distribución normal, representados en el modo tradicional si dispondrían según una curva sigmoideal, mientras que sobre un gráfico normalizado de probabilidad los mismos puntos se dispondrían, como ya se indicó, sobre una recta. La ventaja de verificar la presencia de una línea recta consiste en el hecho que la linealidad puede ser evaluada con una regla. Los puntos que están fuera de la recta son los puntos particulares (anormales), es decir que no pertenecen a la distribución normal.

Si los valores obtenidos fueran los efectos calculados, los puntos fuera de la recta representarían efectos anómalos, no distribuidos normalmente alrededor del cero, entonces son efectos significativos (significativamente diversos de cero). El procedimiento para construir un “normal probability plot” en la evaluación de los efectos de los factores se puede sintetizar en los siguientes pasos:

1. Ordenar de forma creciente los efectos calculados, excluyendo la media (intercepta). En el caso del Half-Normal Plot, antes de ordenar los coeficientes, se los coloca en valor absoluto.
2. Contar el número n de efectos calculados
3. Dividir el intervalo $[0-100]$ en un intervalo de igual longitud $(100/p)$
4. Representar el punto de medio del primer intervalo contra el efecto más pequeño, entonces representar el punto de medio del segundo intervalo contra el segundo efecto en orden creciente, y así sucesivamente. En el eje de las abscisas se grafica el valor del efecto, mientras en el eje de las ordenadas se grafica el valor de la probabilidad acumulada correspondiente a la probabilidad del punto medio del intervalo considerado.

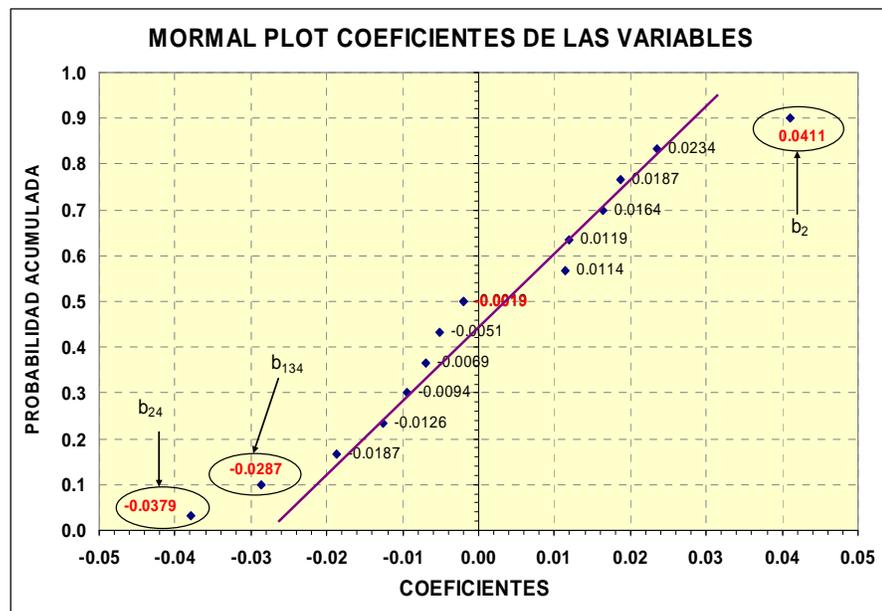


Figura 17. Normal Probability Plots:

Fuente: Autor

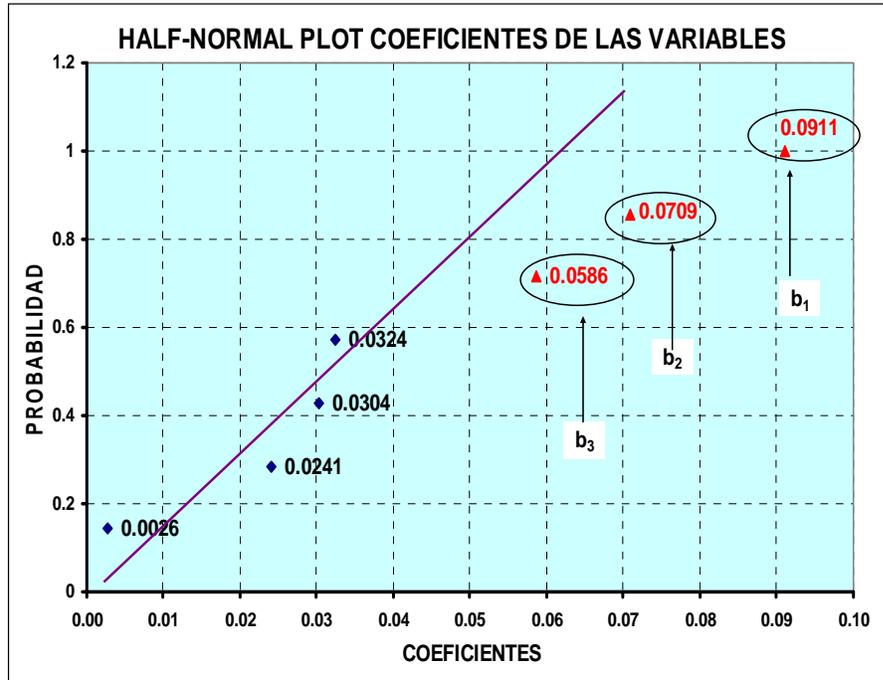


Figura 18. Half Normal Probability Plots:

Fuente: Autor

La ventaja del Half-Normal Plot sobre el Normal Plot, es que siendo todos los datos del Half-Normal Plot positivos, la recta se origina en el punto (0,0) por lo que es más fácil detectar la tendencia de los efectos no significativos.

5.10. Optimización

Los diseños factoriales típicos para los problemas de screening preliminar de los factores relevantes se los consciente para realizar un número mínimo de experimentos suficientes para calcular la importancia o no de cada factor inicialmente considerado, sea únicamente a nivel de efectos principales (diseños de Plackett-Burman) o de efectos principales e interacciones (diseños factoriales). En muchos casos, la solución del problema necesita un modelo más detallado del sistema en estudio. Una primera razón en la búsqueda de una solución optimal es de

encontrar las condiciones que corresponden a un mínimo o a un máximo de la respuesta en estudio. La segunda razón radica en la búsqueda de un modelo cuantitativo los que dan mayor detalle para identificar las relaciones entre la respuesta estudiada y los factores relevantes que describen el sistema.

Desde el punto de vista matemático, esto significa introducir en el modelo al menos los términos cuadráticos de los factores en estudio. La presencia de los términos cuadráticos permite construir curvas de segundo orden visualizables; por ejemplo, superficies de respuesta. Los diseños experimentales que permiten afrontar el problema de la optimización son principalmente los diseños centrales compuestos, diseños de máxima pendiente, de Box-Behnken, el método simplex (MONTGOMERY, 2001) y los diseños de Doherlet (GABRIELSSON, et al, 2002).

5.10.1. Box-Behnken

En ocasiones es deseable e incluso necesario que los factores se ensayen “solo” a tres niveles. Los diseños de Box-Behnken son diseños factoriales incompletos a tres niveles en los que los puntos experimentales están escogidos especialmente para permitir una estimación eficiente de los coeficientes de un modelo de segundo orden. La tabla 9 a continuación contiene los diseño de Box Behnken para k: 3,4 y 5 factores.

Como ayuda para apreciar las simetrías de los diversos diseños las figuras 18 y 19 muestran dos representaciones diferentes del mismo diseño de Box-Behnken a tres niveles con trece ensayos para k= 3 factores. La notación +- 1 se utiliza para indicar los cuatro ensayos de un diseño 2^2 factorial, y la notación 0 se refiere a una columna paralela de ceros. Para cada uno de los k factores, la última fila de ceros se refiere a uno o más puntos centrales del diseño.

Tabla 9. Diseño de Box-Behnken para k= 3,4 y 5 factores

Tres factores:	± 1	± 1	0
	± 1	0	± 1
	0	± 1	± 1
	0	0	0

Cuatro factores:

$$\begin{bmatrix} \pm 1 & \pm 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & \pm 1 & \pm 1 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \\ \dots\dots\dots \\ \pm 1 & 0 & 0 & \pm 1 \\ 0 & \pm 1 & \pm 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \\ \dots\dots\dots \\ \pm 1 & 0 & \pm 1 & 0 \\ 0 & \pm 1 & 0 & \pm 1 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix}$$

Cinco factores:

$$\begin{bmatrix} \pm 1 & \pm 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & \pm 1 & \pm 1 & 0 \\ 0 & \pm 1 & 0 & 0 & \pm 1 \\ \pm 1 & 0 & \pm 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & \pm 1 & \pm 1 \\ \dots\dots\dots \\ 0 & \pm 1 & \pm 1 & 0 & 0 \\ \pm 1 & 0 & 0 & \pm 1 & 0 \\ 0 & 0 & \pm 1 & 0 & \pm 1 \\ \pm 1 & 0 & 0 & 0 & \pm 1 \\ 0 & \pm 1 & 0 & \pm 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix}$$

Fuente: BOX George., HUNTER, William. and HUNTER Stuart. 1978. Statistics for experimenters. An introduction to design, data analysis, and model building. John Wiley & Sons. 653 páginas. United States

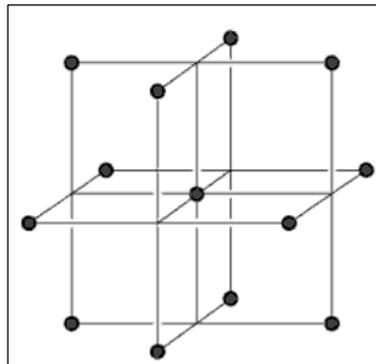


Figura 19. Presentación del Diseño de Box Behnken para tres factores
Fuente: BOX George., HUNTER, William. and HUNTER Stuart. 1978. Statistics for experimenters. An introduction to design, data analysis, and model building. John Wiley & Sons. 653 páginas. United States

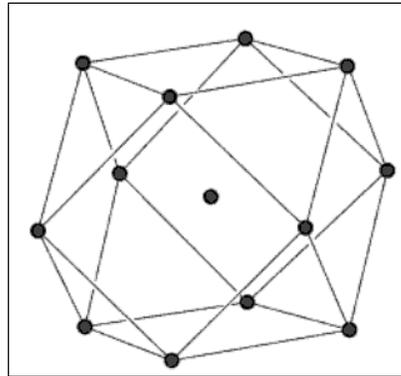


Figura 20. Presentación del Diseño de Box Behnken para tres factores

Fuente: BOX George., HUNTER, William. and HUNTER Stuart. 1978. Statistics for experimenters. An introduction to design, data analysis, and model building. John Wiley & Sons. 653 páginas. United States

El diseño de *Box-Behnken* es una metodología de optimización y se aplica cuando existen tres o más factores y suele ser eficiente en cuanto al número de experimentos (GUTIÉRREZ y DE LA VARA, 2008).

Es un diseño rotatable o casi rotatable que se diferencia en cuanto no tiene experimentos en los vértices de la región experimental.

5.10.2. Simplex

Un simplex es una figura geométrica con $k+1$ esquinas donde k es igual al número de variables en k dimensiones de dominio experimental. Cuando el número de las variables es igual a dos el simplex es un triángulo.

El método simplex es una estrategia de optimización de paso rápido. Esto significa que los experimentos se optimizan uno por uno. La excepción está en el simplex inicial en el cual todos los experimentos son corridos en paralelo.

El principio para una optimización simplex está ilustrada en la Figura 22. Para maximizar el resultado en una síntesis química, por ejemplo, el primer paso es correr $k+1$ experimentos para obtener el simplex inicial. El resultado en cada esquina del simplex es analizado y la esquina que muestra el resultado menos deseable es proyectada hacia el punto geométrico medio de las otras esquinas. En esta forma se obtiene un nuevo simplex.

El producto en cada esquina del simplex es analizado y la esquina muestra el resultado menos deseable que es proyectado a través del punto geométrico de las otras dos esquinas, de esta forma se obtiene un nuevo simplex. Las coordenadas del experimento para la nueva esquina son calculadas y el experimento es realizado. Cuando se determina la respuesta, el peor de las tres esquinas se proyecta de la misma manera como antes y se obtiene un nuevo simplex. Las coordenadas para la nueva esquina son calculadas y el experimento es desarrollado. Cuando el resultado es determinado, el peor de las tres esquinas es observado en la misma forma que al principio y otro nuevo simplex es obtenido, etc. En esta forma, la optimización continua hasta que el simplex ha rotado y el optimo es encerrado. (LUNDSTEDT, et al, 1998)

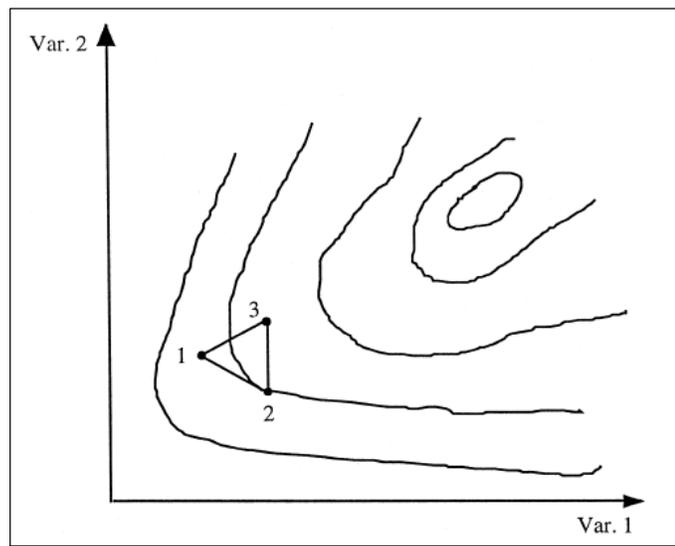


Figura 21. Simplex de dos variables.

Fuente: LUNDSTEDT Torbjörn, SEIFERT Elisabeth, ABRAMO Lisbeth, THELIN, Bernt, NYSTRÖM Åsa, PETTERSEN Jarle, y BERGMAN Rolf. 1998. Experimental design and optimization. Chemometric Intel. Lab. Syst. 42: 3-40. Suiza.

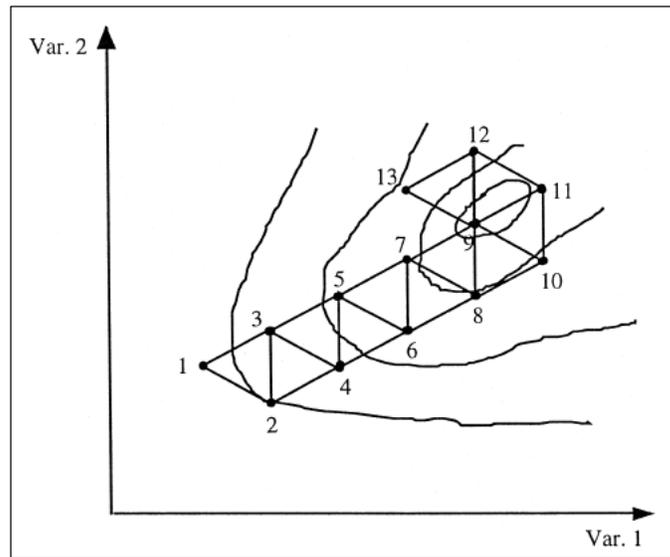


Figura 22. Ilustración de una optimización simplex con dos variables.

Fuente: LUNDSTEDT Torbjörn, SEIFERT Elisabeth, ABRAMO Lisbeth, THELIN, Bernt, NYSTRÖM Åsa, PETTERSEN Jarle, y BERGMAN Rolf. 1998. Experimental design and optimization. Chemometric Intel. Lab. Syst. 42: 3-40. Suiza.

5.10.2.1. Cálculo del escenario experimental para un nuevo experimento en el simplex

Cuando $k + 1$ experimentos en el simplex inicial han sido desarrollados, las respuestas en las diferentes esquinas son examinadas. En un simplex con dos variables, la esquina con el resultado menos deseable es marcada con S. la mejor esquina con B y la segunda mejor con N. M es geoméricamente el punto medio en el hyper plano que es abarcado por las esquinas restantes cuando S es removida, en este caso una línea entre B y N fig. 23. Esta nueva esquina sustituye a S en la siguiente optimización. En una forma simple la duplicación puede ser descrita como sigue:

$$\text{Punto medio: } M = (N + B)/(K)$$

$$\text{Distancia: } d = M - S$$

$$\text{El nuevo punto: } T = M + d$$

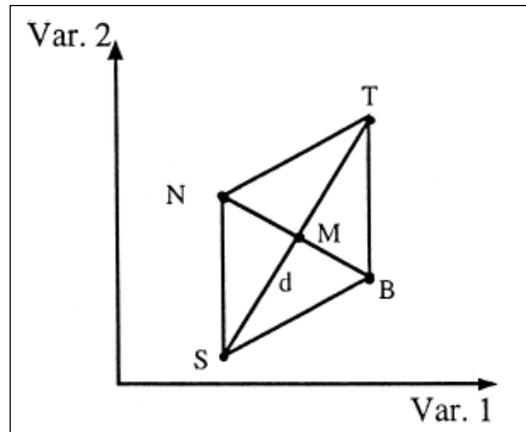


Figura 23. Proyección de la esquina S, con pobre resultado, a la nueva esquina T en el Simplex.

Fuente: LUNDSTEDT Torbjörn, SEIFERT Elisabeth, ABRAMO Lisbeth, THELIN, Bernt, NYSTRÖM Åsa, PETTERSEN Jarle, y BERGMAN Rolf. 1998. Experimental design and optimization. Chemometric Intel. Lab. Syst. 42: 3-40. Suiza.

Con lo cual podemos deducir la siguiente fórmula para la determinación del nuevo punto, la misma que será aplicada en el capítulo experimental:

$$T = M + M - S = \frac{2(N + B)}{k - S}$$

5.10.3. Método de superficie de respuesta

Las superficies de respuesta (LUNDSTEDT, et al, 1998) se utilizan para determinar un punto óptimo. Adicionalmente, es una buena alternativa gráfica que muestra la relación entre las diferentes variables experimentales y la respuesta. Para poder determinar un óptimo es necesario que la función polinomial contenga términos cuadráticos.

$$Y = b_0 + \sum b_j X_j + \sum b_{jk} X_j X_k + \sum b_{jj} X_j^2$$

Para la construcción de superficies de respuesta, el método más utilizado es el diseño central compuesto completo, el cual está constituido de tres partes:

1. Un diseño factorial completo.
2. Uno o más experimentos al punto central.
3. Experimentos simétricamente distribuidos respecto a los ejes de los factores a una distancia $\pm \alpha$ del centro.

$$\alpha = (n_F)^{1/4}$$

donde “ n_F ” es el número de experimentos del diseño factorial, en el caso del diseño 2^3 , serán 8 experimentos.

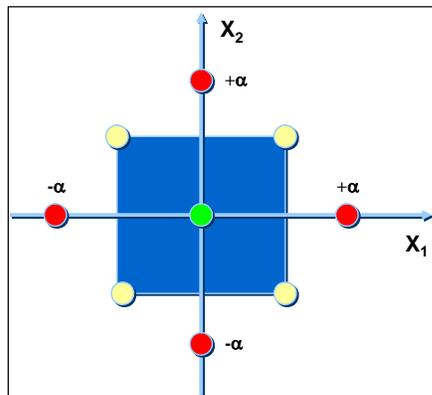


Figura 24. Esquema de un diseño central compuesto a 2 niveles y 2 variables

Fuente: TODESCHINI, Roberto; CONSONNI, Viviana y PAVAN, Manuela. 2006. La metodología della ricerca sperimentale. Milano Chemometrics and Research Group. 213 páginas. Italia.

Del gráfico anterior se deriva la matriz del modelo que permitirá obtener mediante regresión de mínimos cuadrados multivariante el polinomio que representa el comportamiento de las variables y define un gráfico o superficie de respuesta polinomial.

Tabla 10. Matriz del modelo para un diseño central compuesto a 2 niveles y 2 variables

Exp	X_1	X_2	X_1X_2	X_1^2	X_2^2	Y
1	-1	-1	1	1	1	Y_1
2	1	-1	-1	1	1	Y_2
3	-1	1	-1	1	1	Y_3
4	1	1	1	1	1	Y_4
5	0	0	0	0	0	Y_5
6	-1.414	0	0	1.999	0	Y_6
7	1.414	0	0	1.999	0	Y_7
8	0	-1.414	0	0	1.999	Y_8
9	0	1.414	0	0	1.999	Y_9

Fuente: Autor

Para elaborar la gráfica de superficie de respuesta se puede recurrir a varios programas, entre ellos los más relevantes son: *MatLab*, *Statistica*, *Modde*, *Statgraphics Centurion*, *Minitab*, *XIStat-3DPlot*, entre otros; obteniéndose figuras como la que se muestra a continuación.

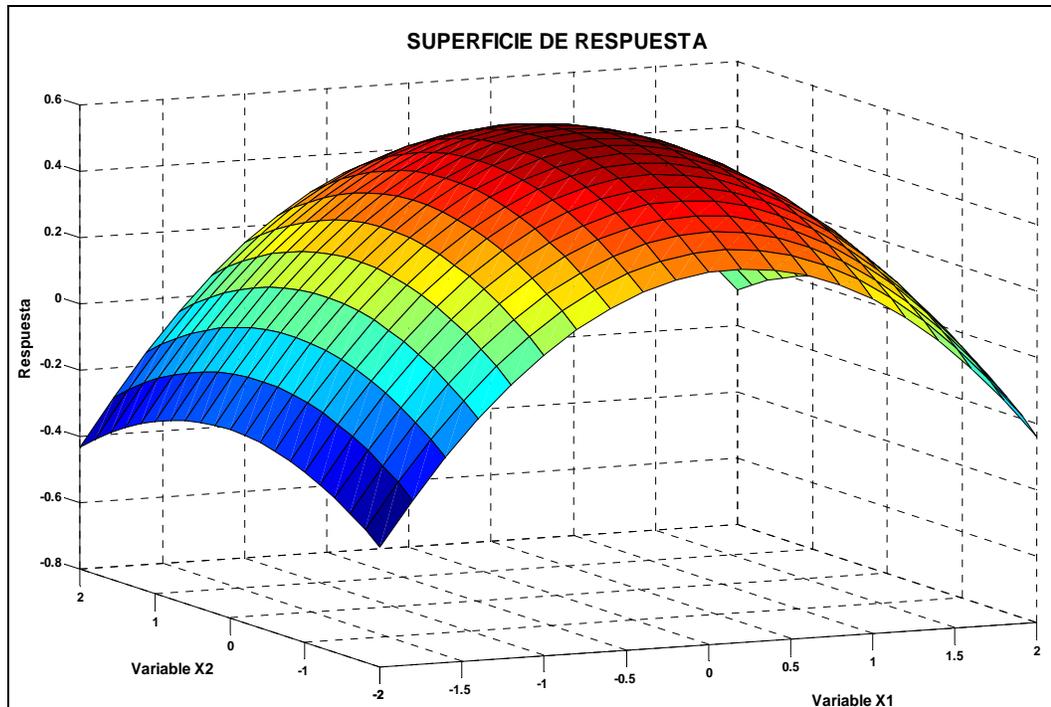


Figura 25. Modelo de superficie de respuesta cuadrático.

Fuente: Autor

Par obtener los puntos exactos máximos y mínimos y verificar si hay puntos sillas durante el método de superficie de respuesta se puede aplicar el Discriminante o Hessiano, Matriz Hessiana. (QUIROGA, 2008).

MATRIZ HESSIANA DE DOS VARIABLES

$$\begin{vmatrix} f_{xx} & f_{xy} \\ f_{xy} & f_{yy} \end{vmatrix} = \begin{vmatrix} \frac{\partial^2 f}{\partial x^2} & \frac{\partial^2 f}{\partial x \partial y} \\ \frac{\partial^2 f}{\partial x \partial y} & \frac{\partial^2 f}{\partial y^2} \end{vmatrix}$$

Donde:

f_{xx} Significa que se deriva la función original por primera vez con respecto a x y luego ese resultado se deriva por segunda vez con respecto a x nuevamente.

f_{xy} Significa que se deriva la función original por primera vez con respecto a x y luego ese resultado se deriva por segunda vez pero ahora con respecto a y.

f_{yy} Significa que se deriva la función original por primera vez con respecto a y y luego ese resultado se deriva por segunda vez con respecto a y nuevamente.

El *determinante* de una matriz es un escalar o polinomio, que resulta de obtener todos los productos posibles de una matriz de acuerdo a una serie de restricciones, siendo denotado como $|\mathbf{H}|$. El valor numérico es conocido también como modulo de la matriz.

Para el caso de dos variables, la matriz hessiana 2×2 se genera de la siguiente manera:

1. Para aplicar la matriz hessiana en primer lugar debemos tener la función original que se va a trabajar, para lo cual tenemos el siguiente ejemplo:

$$FU = 0,5659 + 0,0678X_1 + 0,0195X_3 + 0,0085X_1X_3 - 0,1658X_1^2 - 0,0508X_3^2$$

2. Calcular las primeras derivadas parciales de la función con respecto a cada una de las variables que se tiene la función original.

$$\frac{\partial}{\partial X_1} = 0,0678 + 0,0085X_3 - 0,3316X_1$$

$$\frac{\partial}{\partial X_3} = 0,0195 + 0,0085X_1 - 0,1016X_3$$

3. Igualar a cero las primeras derivadas que se calcularon en el paso 2.

$$1.- 0,0678 + 0,0085X_3 - 0,3316X_1 = 0$$

$$2.- 0,0195 + 0,0085X_1 - 0,1016X_3 = 0$$

4. En las ecuaciones generadas en el paso 3 encontrar el valor de cada una de las variables. Esos valores encontrados para cada una de las variables serán las coordenadas de los puntos críticos.

En 1 despejamos X_3 :

$$X_3 = \frac{0,3316X_1 - 0,0678}{0,0085}$$

Reemplazamos el valor de X_3 en la ecuación 2 y obtenemos el valor de X_1 :

$$0,0085X_1 = 0,1016 \left(\frac{0,3316X_1 - 0,0678}{0,0085} \right) - 0,0195$$

$$-0,0336X_1 = -7,0543 \times 10^{-3}$$

$$X_1 = 0,21$$

Reemplazamos el valor de X_1 en la ecuación 1:

$$X_3 = \frac{0,3316(0,21) - 0,0678}{0,0085}$$

$$X_3 = 0,216$$

5. Teniendo los puntos críticos que se encontraron en el paso 4, se tiene que calcular las segundas derivadas parciales en el punto crítico, para asignar los valores de cada elemento de la matriz hessiana:

$$f_{x_1x_1} = -0,3316$$

$$f_{x_1x_3} = 0,0085$$

$$f_{x_3x_3} = -0,1016$$

6. Resolver la matriz hessiana normalmente como se resuelve la determinante de una matriz cuadrada. El resultado que se obtenga de la matriz hessiana es la respuesta.

$$H_{x_1x_3} = \begin{vmatrix} f_{x_1x_1} & f_{x_1x_3} \\ f_{x_1x_3} & f_{x_3x_3} \end{vmatrix} = \begin{vmatrix} \frac{\partial^2 f}{\partial x_1^2} & \frac{\partial^2 f}{\partial x_1 \partial x_3} \\ \frac{\partial^2 f}{\partial x_1 \partial x_3} & \frac{\partial^2 f}{\partial x_3^2} \end{vmatrix}$$

$$H = \begin{vmatrix} -0,3316 & 0,0085 \\ 0,0085 & -0,1016 \end{vmatrix}$$

$$\det(H) = 0,03376$$

7. Se sacan conclusiones de la respuesta obtenida en el paso 6 de la siguiente manera:
- a) Si el determinante de la matriz hessiana es mayor que cero, entonces se procede a ver si f_{xx} es positivo o negativo. Si f_{xx} es positivo o mayor que cero entonces la función tiene un MÍNIMO en el punto crítico. Si f_{xx} es negativo o menor que cero entonces la función tiene un MÁXIMO en el punto crítico.

Como $\det'(H) = 0,03376 > 0$ procedemos a verificar si f_{xx} y f_{yy} son mayores o menores que 0:

$f_{xx} = -0,3316 < 0$ por lo tanto la función utilidad tiene un máximo en el punto crítico $X_1 = 0,21$

$f_{yy} = -0,1016 < 0$ por lo tanto la función utilidad tiene un máximo en el punto crítico $X_3 = 0,216$

b) Si el determinante de la matriz hessiana es menor que cero entonces se concluye que la función tiene un PUNTO DE SILLA en el punto crítico.

Como $\det'(H) = 0,03376 > 0$ procedemos a verificar que la función no tiene punto silla en el punto crítico.

c) Si el determinante de la matriz hessiana es cero entonces se concluye que NO HAY INFORMACIÓN o EL CRITERIO NO ES CONCLUYENTE.

Como $\det'(H) = 0,03376 > 0$ podemos resumir que la información o el criterio si es concluyente.

5.10.4. Método de la máxima pendiente

El método de la máxima pendiente (CARLSON y CARLSON, 1992) se basa en la pendiente de la superficie de respuesta, asumiendo un modelo lineal. Ésta se obtiene evaluando los incrementos asignados a cualquier variable en modo de maximizar la respuesta.

$$y = b_0 + \sum_{j=1}^k b_j x_j$$

$$y + \Delta y = b_0 + \sum_{j=1}^k b_j (x_j + \Delta x_j)$$

$$\Delta y = \sum_{j=1}^k b_j \Delta x_j$$

Para obtener el máximo incremento Δy , cualquier variable x_j debe ser modificada por un incremento Δx_j proporcional al coeficiente b_j :

$$\Delta x = b.k$$

$$\begin{bmatrix} x_1' \\ x_2' \\ \dots \\ x_j' \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} x_1 \\ x_2 \\ \dots \\ x_j \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} \Delta x_1 \\ \Delta x_2 \\ \dots \\ \Delta x_j \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} x_1 \\ x_2 \\ \dots \\ x_j \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} b_1 \\ b_2 \\ \dots \\ b_j \end{bmatrix} \cdot k$$

El método de la máxima pendiente resulta muy eficiente incluso cuando se requiere optimizar muchas variables al mismo tiempo. Como desventajas del método se tiene que la solución no es invariante al escalado de las variables y los valores de óptimo son cercanos a la solución optimal absoluta.

5.11. Evaluación sensorial

La valoración sensorial ha demostrado ser un instrumento de gran eficacia para el control de calidad y aceptabilidad de un alimento. (SANCHO et al, 2002). El análisis sensorial se ha definido como una disciplina científica usada para medir, analizar e interpretar las reacciones percibidas por los sentidos de las personas hacia ciertas características intrínsecas de un alimento como son su sabor, olor, color y textura, que son los indicadores organolépticos de aceptación o rechazo de un producto, por lo que el resultado de este complejo de sensaciones captadas e interpretadas son usadas para medir la calidad de los mismos. La valoración sensorial es útil además para el control del proceso, tanto como adaptación del alimento a su perfil final, como para realizar modificaciones o correcciones; permitiendo obtener condiciones para conseguir datos que posteriormente serán tratados estadísticamente.

5. 12. Funciones de utilidad

Las funciones de utilidad son metodologías muy conocidas de las estrategias de decisión multicriterio. (PAVAN, 2003) El enfoque es la forma más simple y fácilmente entendible para tomar decisiones a partir de una gran variedad de fuentes, ya que no requiere ninguna restricción fuerte en las estructuras de preferencia de la fórmula. Estas se basan en la definición del valor de la función parcial, es decir, una función de transformación t , para cada criterio en forma de estandarizar el valor de la

función parcial transformando los valores del criterio en una misma escala. Por lo general se necesitan definir la mejor y peor condición para cada criterio. La función de utilidad parcial se define como:

$$u_{ki} = f_k(Y_{ki}) \quad 0 \leq u_{ki} \leq 1$$

donde k es el criterio seleccionado, f es el tipo de función preestablecida, Y_{ki} es el valor de la i -ésima muestra por el k -ésimo criterio (Figura 26)

Los valores de la función de utilidad deben estar comprendidos entre cero y uno. La función de utilidad global es la sumatoria de cada función parcial por el peso asignado:

$$U = \sum_k w_k u_{ki} \quad 0 \leq U \leq 1$$

donde w_k son los pesos que satisfacen la relación $\sum_k w_k = 1$.

Comúnmente las funciones de utilidad son:

1. Función lineal
2. Función sigmoidea
3. Función box invertido
4. Función parabólica
5. Función triangular inversa
6. Función logarítmica
7. Función a escala
8. Función triangular
9. función lineal inversa

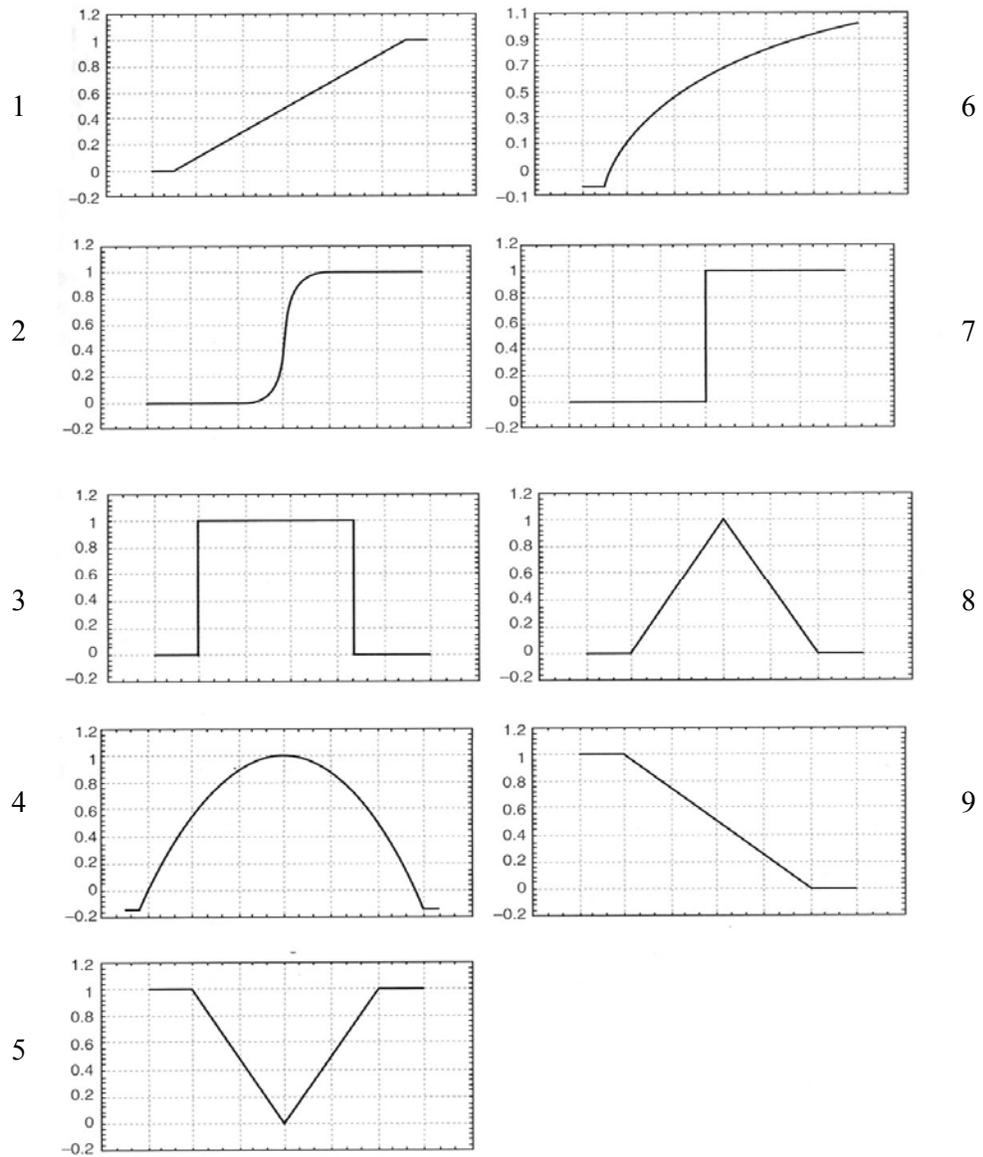


Figura 26. Representación gráfica de las funciones de utilidad.

Fuente: TODESCHINI, Roberto; CONSONNI, Viviana y PAVAN, Manuela. 2006. La metodología della ricerca sperimentale. Milano Chemometrics and Research Group. 213 páginas. Italia.

Tabla 11. CATEGORÍAS DE LOS VALORES DE UTILIDAD “U”

Valor de “U”	Valoración de la utilidad
1,00 – 0,80	Excelente
0,80 – 0,63	Bueno
0,63 – 0,37	Aceptable – mediocre
0,37 – 0,20	Límite de aceptabilidad
0,20 – 0,00	No aceptable

Fuente: TODESCHINI, Roberto; CONSONNI, Viviana y PAVAN, Manuela. 2006. La metodología della ricerca sperimentale. Milano Chemometrics and Research Group. 213 páginas. Italia.

Para el calcular las funciones de utilidad se puede recurrir al uso de programas computacionales capaces de procesar y buscar una serie de valores de escala de cada atributo que, una vez sumados para poder producir el valor de utilidad total, corresponderán a las clasificaciones de la evaluación global, de manera tan estrecha como sea posible. Entre estos programas el que más aplicado es el programa de uso gratuito DART.

5.13. Conclusiones:

Es necesario conocer los fundamentos y filosofía sobre los que se sostiene el diseño experimental. Este conocimiento permitirá poder interpretar de mejor manera los resultados que se proponen en el siguiente capítulo; dentro del cual se ha logrado optimizar los resultados experimentados a través de la selección de las estrategias más adecuadas para las variables en estudio.

Capítulo 6

DESARROLLO EXPERIMENTAL

6.2. MATERIALES Y MÉTODOS

6.2.1. Materiales

Para la obtención del extracto hidrosoluble de soya se diluyó pasta de soya previamente obtenida de granos frescos y siguiendo el procedimiento explicado en el diagrama de flujo que se observa en la Figura No 26. Para lo cual fueron necesarios los siguientes equipos:

- Blender de acero inoxidable con las siguientes características básicas:
Motor de 1 hp y 3.750 RPM
- Despulpador
Motor de 2 hp y 4500 RPM
- Lienzos de tela porosidad fina.

Para el desarrollo experimental fueron utilizados los laboratorios de química física y de tecnología de alimentos de la Universidad del Azuay dentro de los cuales se dispuso de los siguientes implementos y equipos:

- Probeta 1000mL.
- Vasos de Precipitación
- Balanza analítica.
- Agitador con regulador de velocidad.
- pH-metro
- Termómetro
- Controlador de Temperatura
- Estufa
- Crioscopio Cryostar I

Para los procesos analíticos se utilizaron los siguientes insumos:

- Enzima de actividad proteolítica bromelina de disponibilidad comercial marca McComick, la cual no se encuentra en estado puro y esta mezclada con sal, azúcar y silicato de calcio.
- El inóculo con el que se trabajó es comercial de la marca Hansen su codificación es el CHN-11 que contiene principalmente bacterias del genero *Lactococcus* y *Leuconostoc*.
- Las sales gelificantes que se utilizaron fueron el Cloruro de magnesio y Cloruro de calcio de grado alimentario.
- Como materia prima se ha utilizado extracto hidrosoluble de soya en una proporción de 8.5% de sólidos totales, realizado con pasta de soya obtenida previamente de granos frescos y desecada a 110° para la estandarización de la humedad.

6.2.2. Métodos experimentales

6.2.2.1. Proceso de hidrólisis:

En el proceso de hidrólisis se aplicaron los siguientes métodos de optimización:

- Un diseño factorial siguiendo la metodología planteada por el método Box-Behnken, es decir a tres niveles, para la evaluación de las variables en la etapa de screening.
- Un half-normal plot para la valoración y ponderación de los coeficientes obtenidos en el screening
- Optimización por superficie de respuesta de las dos variables significativas.
- Optimización por el método simplex de las dos variables significativas.

6.2.2.2. Proceso de gelificación:

En el proceso de gelificación se evalúa la sinergia existente entre las dos sales de gelificación y la relación con la temperatura en la que se desarrolla la coagulación iónica. Para lo cual se aplicaron los siguientes métodos de optimización:

- Un diseño factorial siguiendo la metodología planteada por el método Box-Behnken, es decir a tres niveles, para la evaluación de las variables en la etapa de screening.

- El método de error expandido para la valoración y ponderación de los coeficientes obtenidos en la regresión de mínimos cuadrados corrida en el screening
- Optimización por el método de máxima pendiente.

6.2.2.3. Proceso de fermentación:

En el proceso de fermentación se evaluó la influencia de las variables más importantes del proceso. Para esto cada experimento fue evaluado utilizando análisis sensorial a través de un panel de catadores semientrenados y mediante la aplicación de funciones de utilidad se estableció la influencia de las variables y la mejor combinación de las mismas. Para lo cual se aplicaron los siguientes métodos de optimización:

- Un diseño factorial completo.
- El método de error expandido para la valoración y ponderación de los coeficientes obtenidos en la regresión de mínimos cuadrados corrida en el screening.
- Optimización por el método de superficie de respuesta.

6.2.3. Aplicación de Métodos experimentales

6.2.3.1. Proceso de hidrólisis:

6.2.3.1.1 Introducción

En esta primera etapa del proceso de optimización se evaluó la influencia que tienen la combinación de las variables: porcentaje de enzima, temperatura, y tiempo en la velocidad de hidrólisis enzimática de leche de soya de tal forma que lo que se optimizó fue la velocidad de la reacción. La medición se realizó evaluando el descenso en el punto crioscópico a través del “CryoStar I”. Esto se justifica debido a que la proteólisis controlada provoca la liberación de péptidos de la proteína nativa, lo que además produce un descenso del pH, situación que puede ser analizada siguiendo los cambios en la crioscopía de la leche para lo cual se evalúan las diferentes combinaciones dadas por el diseño de Box Behnken. A continuación en la figura 26

se presenta un diagrama de flujo de las operaciones que fueran necesarias para la obtención del extracto hidrosoluble de soya y su posterior hidrólisis.



Fotografía 1. Cryostar I de FUNKE GERBER

Fuente: Autor

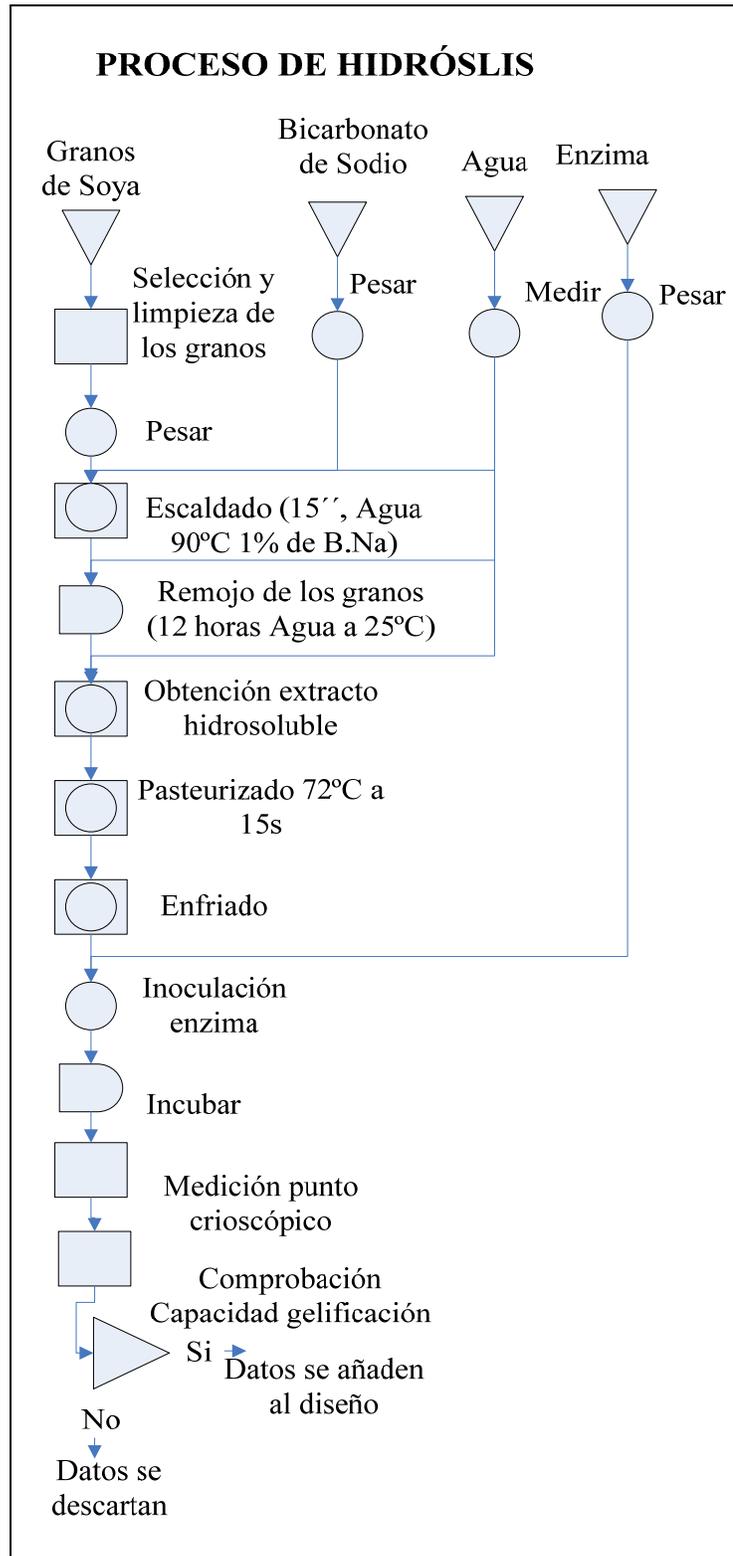


Figura 26. Diagrama de Flujo proceso de hidrólisis enzimática.
 Fuente: Autor

6.2.3.1.2 Variables de estudio

Para el desarrollo experimental de este primer proceso se han propuesto las variables que figuran en la tabla 11 para estudiarlas combinadamente frente al descenso en el punto crioscópico que presentó cada experimento en estado viable de gelificación. Adicional a ello en la siguiente tabla 12 se presentan los valores crioscópicos de la leche sin hidrolizar.

Tabla 11. Variables y condiciones experimentales de screening proceso de hidrólisis

LD.	Variable	Unidad	Mínimo	Central	Máximo
			-1	0	1
X ₁	Porcentaje de enzima	%	0,3	0,5	0,7
X ₂	Temperatura de hidrólisis	°C	32	35	38
X ₃	Tiempo de hidrólisis	minutos	25	50	75

Fuente: Autor

6.2.3.1.3 Matriz del modelo experimental

Con las variables señaladas en la tabla 11 se planificó y desarrolló un diseño experimental factorial incompleto a tres niveles para 3 variables, resultando la siguiente matriz del modelo:

Tabla 12. Matriz del modelo Box Behnken etapa de hidrólisis

Exp.	I	X1	X2	X3	X1.X1	X2.X2	X3.X3	Crios.
1	1	-1	-1	0	1	1	0	-0,3101
2	1	1	-1	0	1	1	0	-0,5305
3	1	-1	1	0	1	1	0	-0,3191
4	1	1	1	0	1	1	0	-0,5457
5	1	-1	0	-1	1	0	1	-0,3118
6	1	1	0	-1	1	0	1	-0,4843
7	1	-1	0	1	1	0	1	-0,3127
8	1	1	0	1	1	0	1	-0,4850
9	1	0	-1	-1	0	1	1	-0,3848
10	1	0	1	-1	0	1	1	-0,3905
11	1	0	-1	1	0	1	1	-0,4081
12	1	0	1	1	0	1	1	-0,4160
R1	1	0	0	0	0	0	0	-0,4322
R2	1	0	0	0	0	0	0	-0,4325
R3	1	0	0	0	0	0	0	-0,4357
R4	1	0	0	0	0	0	0	-0,4306

Fuente: Autor

6.2.3.1.4 Coeficientes del modelo

Mediante regresión de mínimos cuadrados ordinarios (OLS) (DRAPER y SMITH, 1981) se obtuvieron los coeficientes del modelo.

Tabla 13. Coeficientes de las variables de screening etapa de hidrólisis

Coef.	b_0	b_1	b_2	b_3	b_{11}	b_{22}	b_{33}
	-0.4322	-0.0990	-0.0047	-0.0063	0.0036	0.0022	0.0301

Fuente: Autor

6.2.3.1.5 Ponderación de variables.

Para observar las variables ponderantes en el modelo, se utilizó el Half-Normal Plot (BOX et al, 1978); como se observa en la figura siguiente:

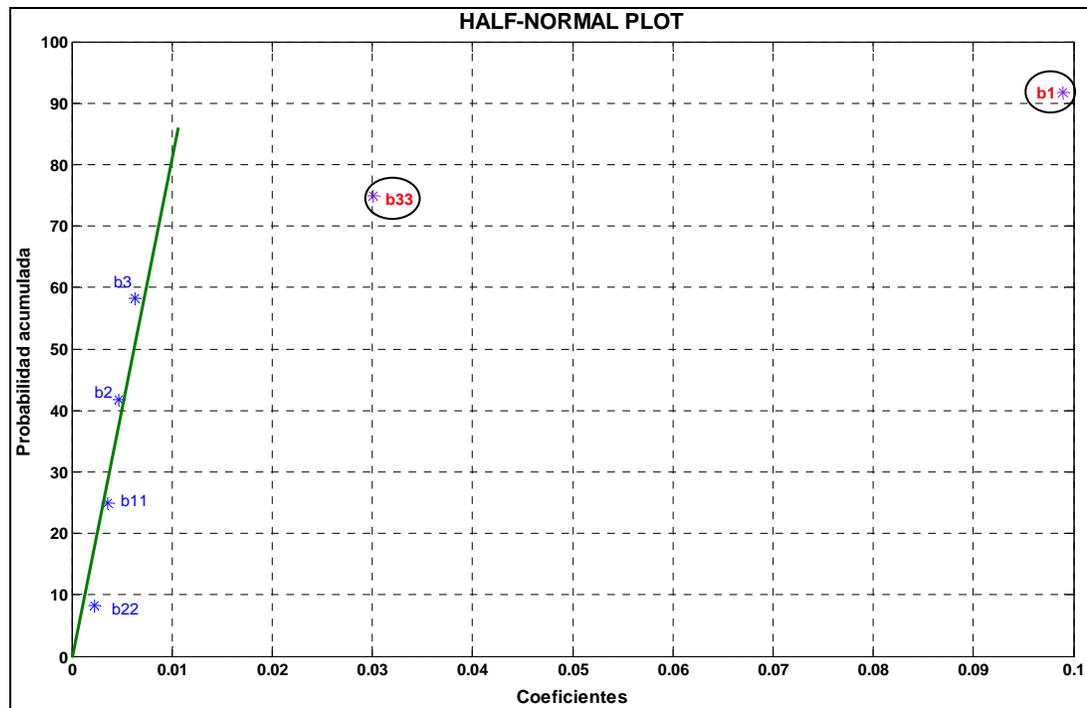


Figura 27. Half-Normal Plot de los coeficientes de regresión proceso de hidrólisis enzimática

Fuente: Autor

Se observa que existen 2 puntos distantes de la recta de distribución que corresponden a los coeficientes de las variables influyentes en el diseño en estudio, los cuales corresponden a las variables: X_1 y X_3 . El polinomio de screening resulta ser:

$$Y = -0.4322 - 0.0990X_1 + 0.0301X_3^2$$

6.2.3.1.6 Aplicación de Superficie de respuesta

La gráfica del polinomio anterior brinda una visión más clara del comportamiento y a donde se ubica el campo de mayor hidrólisis.

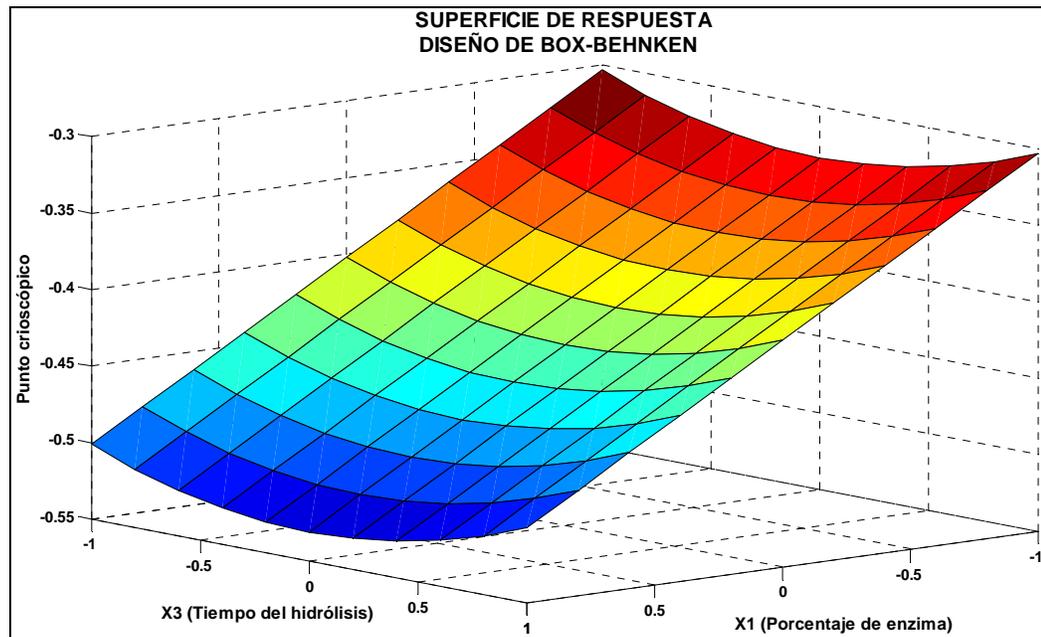


Figura 28. Superficie de respuesta

Fuente: Autor

El polinomio 1 y figura 2 muestran la relación que existe entre el tiempo de hidrólisis y el porcentaje de enzima aplicados, y la forma cómo influyen en el descenso del punto de crioscópico. El porcentaje de enzima actúa de forma antagónica en una proporción de 3 veces más que el tiempo, presentando el mejor campo de respuesta a bajos porcentajes; mientras que el tiempo de hidrólisis en efecto cuadrático presenta un sinergismo sobre la hidrólisis. Queda demostrada la alta especificidad de la bromelina para hidrolizar las uniones peptídicas de la proteína de soya (BRAVERMAN, 1980)

6.2.3.1.7 Optimización por método simplex.

Para optimizar se ha utilizado la metodología Simplex. La figura 3 esquematiza el recorrido del método en búsqueda del óptimo.

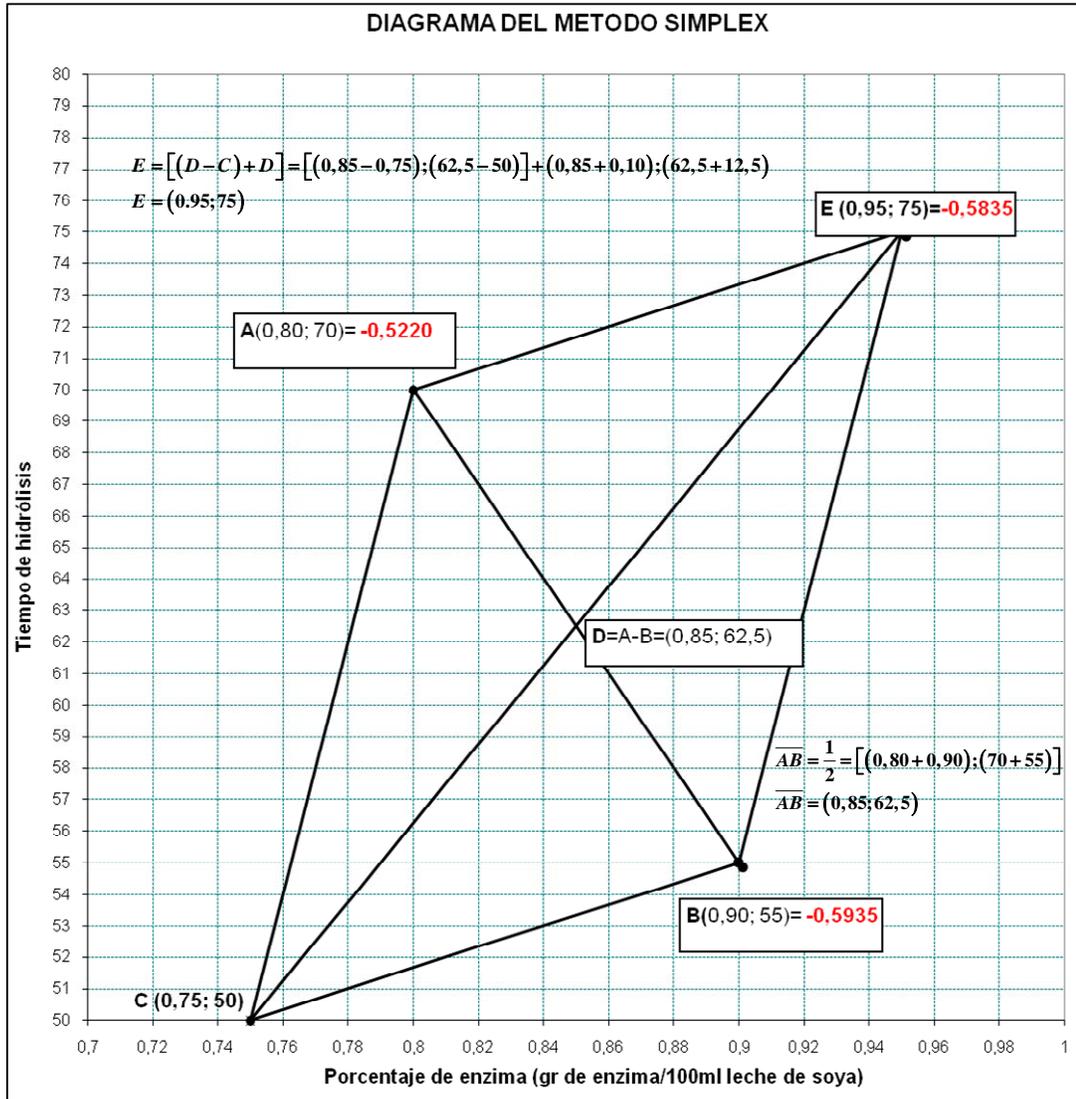


Figura 29. Aplicación del método simplex

Fuente: Autor

Resultando un descenso del punto crioscópico de -0.5935. Quedando así establecidas las mejores condiciones para esta primera etapa; las que corresponden a 0.90% de enzima y 55 minutos para el tiempo de hidrólisis; mientras que la temperatura se mantuvo fijo a un valor de 32°C.

6.2.3.2. Proceso de Gelificación:

6.2.3.2.1. Introducción

En el proceso de gelificación, fueron mezcladas las sales y diluidas en 100 mL de agua, se aplicó cuando el extracto de soya, previamente hidrolizado según el paso anterior, alcanzaba la temperatura de cada experimento y son incubadas por 30 minutos. El gel (coágulo) obtenido fue sometido a desecación para calcular el extracto seco de cada experimento. En este proceso se definió tres variables consideradas las más importantes y críticas para la formación del coágulo. El siguiente diagrama de flujo muestra las actividades cumplidas durante este segundo proceso.



Fotografía 2. Calentamiento extracto hidrosoluble de soya

Fuente: Autor



Fotografía 3. Gelificación

Fuente: Autor

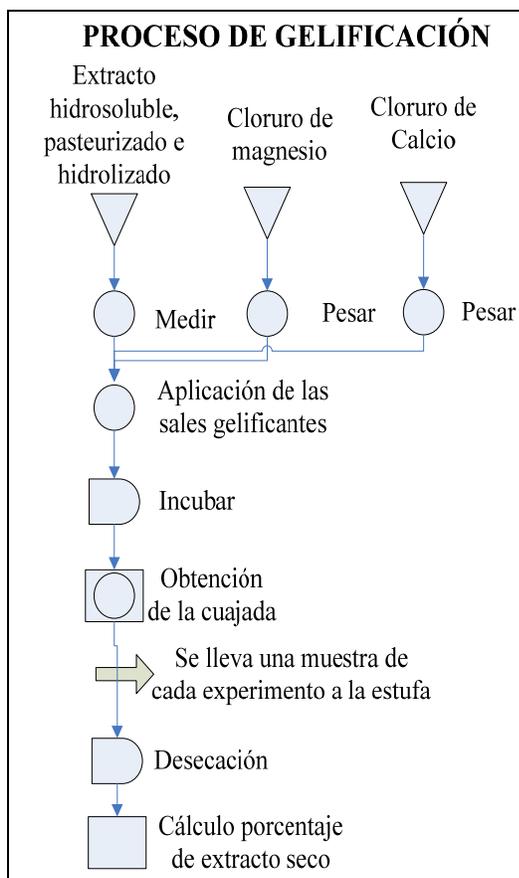


Figura 30. Diagrama de Flujo proceso de gelificación.

Fuente: Autor

6.2.3.2.2. Variables experimentales

La siguiente tabla muestra las condiciones experimentales:

Tabla 14. Variables y condiciones experimentales etapa de gelificación

I.D.	Variable	Unidad	Mínimo -1	Central 0	Máximo 1
X ₁	Cloruro de magnesio	%	0.3	0.35	0.4
X ₂	Cloruro de calcio	%	0.2	0.25	0.3
X ₃	Temperatura de gelificación	°C	80	85	90

Fuente: Autor

Se planificó y ejecutó un diseño experimental de Box-Behnken. La respuesta medida en este proceso correspondió a la cantidad de extracto seco a 100°C luego del escurrido del gel formado en un lienzo. La tabla 5 muestra la matriz del modelo y la respuesta experimental.

6.2.3.2.3. Matriz del diseño experimental

Tabla 15. Matriz del modelo Box Behnken etapa de gelificación

Exp.	I	X ₁	X ₂	X ₃	X ₁ ²	X ₂ ²	X ₃ ²	% E. Seco
1	1	-1	-1	0	1	1	0	8.440
2	1	1	-1	0	1	1	0	8.590
3	1	-1	1	0	1	1	0	10.179
4	1	1	1	0	1	1	0	9.939
5	1	-1	0	-1	1	0	1	9.029
6	1	1	0	-1	1	0	1	11.846
7	1	-1	0	1	1	0	1	9.970
8	1	1	0	1	1	0	1	10.739
9	1	0	-1	-1	0	1	1	8.965
10	1	0	1	-1	0	1	1	7.991
11	1	0	-1	1	0	1	1	10.461
12	1	0	1	1	0	1	1	11.092
13	1	0	0	0	0	0	0	9.549
R ₁		0	0	0				10.896
R ₂		0	0	0				10.248
R ₃		0	0	0				10.924
R ₄		0	0	0				10.645

Fuente: Autor

Las 4 réplicas al punto central sirven para estimar el error expandido (MASSART, 1997); para lo cual se calcula la desviación estándar y el valor del *t* student.

6.2.3.2.4 Coeficientes de las variables de screening

Tabla 16. Coeficientes de las variables de screening etapa de gelificación

Coef.	b ₀	b ₁	b ₂	b ₃	b ₁₁	b ₂₂	b ₃₃
	9.5487	0.4372	0.3431	0.5538	0.2536	-0.5153	0.5940

Fuente: Autor

Mediante regresión OLS se obtuvieron los coeficientes, que comparados con el error, establece las variables significativas.

Tabla 17. Error expandido de los coeficientes de regresión

	Std= 0.31281	alfa= 0.025	gl= 16	t _{student} = 2.4729			
	b ₀	b ₁	b ₂	b ₃	b ₁₁	b ₂₂	b ₃₃
C _{jj}	1	0.125	0.125	0.125	0.4375	0.4375	0.4375
U _{exp}	0.7736	0.2735	0.2735	0.2735	0.5117	0.5117	0.5117

Fuente: Autor

Se estableció entonces el polinomio de screening de la segunda etapa el cual corresponde a:

$$E.S. = 9.5487 + 0.4372X_1 + 0.3431X_2 + 0.5538X_3 - 0.5153X_2^2 + 0.5940X_3^2$$

Del polinomio 2 se rescata que son importantes todas las variables, principalmente a nivel de efectos principales de forma sinérgica. No existe efectos de interacción; es decir no se encontraron ni sinergias ni antagonismos que determinen grandes cambios en el extracto seco. Se justifica que la temperatura en este proceso sea la variable más importante, debido a que el calor es esencial para desnaturalizar las proteínas que van a exponer sus regiones hidrofóbicas y los grupos sulfhidrilos para facilitar la obtención de una coagulación eficiente. La coagulación de las proteínas de soya ocurre cuando ellas son insolubilizadas irreversiblemente como resultado del desdoblamiento de las moléculas que son atraídas por la neutralización de sus cargas para formar puentes intermoleculares, cuando son adicionadas sales de magnesio o calcio. La coagulación por el uso de iones ocurre en consecuencia de la disminución de las cargas negativas de la proteína como resultado de la unión de iones positivos con aminoácidos cargados negativamente en las moléculas de la proteína. Finalmente la molécula abierta es capaz de agregar los nuevos iones, y de esa forma la coagulación es irreversible (CIABOTTI, 2007).

6.2.3.2.5 Optimización por el método de máxima pendiente.

Se optó por aplicar el diseño de máxima pendiente para encontrar un punto de mejor respuesta; para lo cual se toma como punto de ascenso el mejor experimento del diseño de Box-Behenken (experimento 6). Las condiciones para el nuevo experimento se observa en la siguiente tabla:

Tabla 18. Valores experimentales para el diseño de máxima pendiente

Var.	Escalado	Coef	K	Nueva Var.	Nuevo Esc.	V. Real
X ₁	1	0.43716	0.5	X ₁ '	1.21858	0.41
X ₂	0	0.34312		X ₂ '	0.17156	0.26
X ₃	-1	0.55381		X ₃ '	-0.723095	81.4

Fuente: Autor

Se realiza la corrida del nuevo experimento con las siguientes condiciones experimentales, 0.41% de cloruro de magnesio, 0.26% de cloruro de calcio y 81.4°C para la temperatura de gelificación. Con estas condiciones experimentales se obtiene como respuesta un valor de extracto seco de 12.76%, que comparándola con la del experimento de partido refleja un aumento.

6.2.3.3. Proceso de fermentación:

En el proceso de fermentación se siguió el procedimiento optimizado de las dos fases anteriores al que se le añade una post curación del gel obtenido dentro del suero de leche de soya, por el tiempo que establece cada experimento. Esta etapa presenta inicialmente un estudio exploratorio de screening en el que se evalúan los factores del proceso de fermentación de soya tipo spread que influyen en la calidad sensorial del mismo, aplicando para tal efecto un diseño factorial 2^3 . El siguiente gráfico muestra las actividades que fueron realizadas durante este proceso.

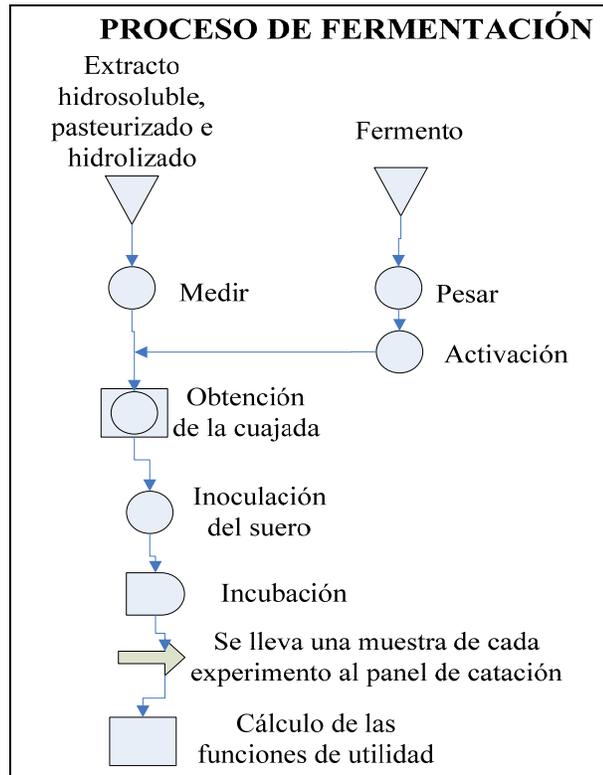


Figura 31 Diagrama de flujo del proceso de fermentación.

Fuente: Autor

6.2.3.3.1 Variables del proceso.

Para el desarrollo experimental se ha propuesto las siguientes variables para estudiarlas combinadamente frente a las características sensoriales del producto final:

Tabla 19. Variables y condiciones experimentales etapa de fermentación

I.D.	Variable	Unidad	Mínimo -1	Central 0	Máximo 1
X ₁	Inóculo de fermento	%	0	2	4
X ₂	Temperatura de fermentación	°C	22	32	44
X ₃	Tiempo de fermentación	horas	1	6	11

Fuente: Autor

6.2.3.3.2 Evaluación Sensorial

Con las variables señaladas en la tabla 9 se planificó y ejecutó un diseño experimental factorial completo a 2 niveles. Mediante una ficha de evaluación sensorial diseñada para la valoración, cada uno de los experimentos ejecutados fue testeado sensorialmente uno por día. Se utilizó un panel semientrenado conformado por 30 personas; para familiarizar al grupo de catación con el análisis a realizar, se prepararon previamente una serie de muestras al azar de la matriz del diseño. En el análisis se utilizó la prueba descriptiva con calificación de escalas de intervalo (ANZALDÚA, 1994).

En ésta, cada juez registró dentro de la ficha de catación las percepciones sensoriales en una escala ordinal. Para estudiar las respuestas generadas se ha utilizado funciones de utilidad, con la finalidad de modular y puntuar cada una de las percepciones sensoriales.

6.2.3.3.3 Funciones de utilidad de los parámetros sensoriales

La función lineal y logarítmica premian los atributos que se esperan sean los más aceptables en el producto. Estas sensaciones corresponden a: Tonalidad blanco, aroma agradable, primera impresión y la calidad del producto final. La función inversa lineal penaliza los atributos de forma proporcional, este tipo de función se usa normalmente cuando se trabaja con atributos no deseables. Los atributos modulados con ésta función son: Tonalidad amarilla, tonalidad rosada, aroma desagradable, gusto dulce, gusto amargo, gusto picante, otro gusto y otro regusto. La función normal premia la presencia intermedia de los atributos, esto quiere decir que no debe existir ausencia, ni una presencia muy marcada de un cierto atributo. Con esta función se evaluó los atributos: Gusto salado, gusto ácido y regusto ácido.

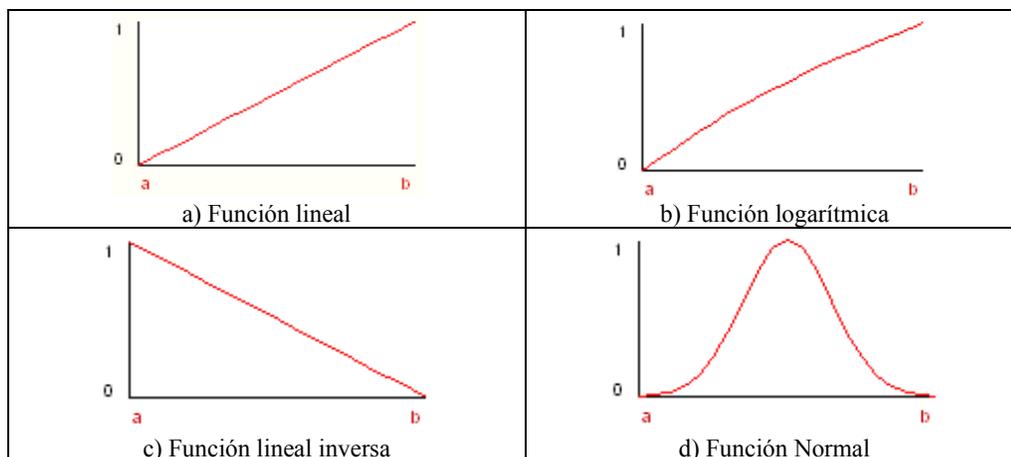


Figura 32. Funciones de utilidad

Fuente: Autor

La función de utilidad total representó la aceptación global del producto por cada una de las modulaciones de los atributos. Esta función utilidad corresponde a la respuesta experimental (Y) de cada experimento. La matriz del diseño queda definida de la siguiente forma:

6.2.3.3.4 Matriz del diseño experimental screening

Tabla 20. Matriz del modelo factorial incompleto etapa de fermentación

Exp.	I	X ₁	X ₂	X ₃	X ₁ X ₂	X ₁ X ₃	X ₂ X ₃	X ₁ X ₂ X ₃	F.U.
1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	0.282
2	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	0.407
3	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	0.313
4	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	0.376
5	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	0.345
6	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	0.470
7	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	0.345
8	1	1	1	1	1	1	1	1	0.408
R ₁		0	0	0					0.532
R ₂		0	0	0					0.532
R ₃		0	0	0					0.532
R ₄		0	0	0					0.595

Fuente: Autor

Esta respuesta se utilizó para calcular los coeficientes del modelo de regresión del diseño experimental mediante aplicación de regresión de mínimos cuadrados ordinarios OLS.

6.2.3.3.5 Coeficientes de las variables de screening

Tabla 21. Coeficientes de las variables etapa de fermentación

Coef.	b_0	b_1	b_2	b_3	b_{12}	b_{13}	b_{23}	b_{123}
	0.368	0.047	-0.008	0.024	-0.016	0.000	-0.008	0.000

Fuente: Autor

El error experimental expandido se utilizó para establecer los coeficientes significativamente diversos de cero.

Tabla 22. Parámetros para el cálculo del error expandido

Std= 0.03150	alfa= 0.05
gl= 11	$t_{\text{student}}= 2.2010$
$U_{\text{expand.}} = 0.02451$	

Fuente: Autor

6.2.3.3.6 Ponderación de variables

En la tabla 21 Se observa que la variable X_1 es significativa, mientras que la variable X_3 está al borde de la comparación con el error, por lo que se ha decidido mantenerla como significativa. Queda establecido el modelo de screening del tercer proceso:

$$Y = 0.368 + 0.047X_1 + 0.024X_3$$

Del polinomio anterior se rescata que las variables son sinérgicas; es decir, a medida que aumenta el porcentaje de inóculo y el tiempo de fermentación, la respuesta de aceptación sensorial viene favorecida. Esto se explica debido a la capacidad heterofermentativa del inóculo utilizado el cual ha sido capaz de degradar los oligosacáridos presentes en la soya en varios componentes de características aromáticas (AHMAD et al, 2008).

De esta forma la fermentación contribuye beneficiosamente al proceso tecnológico y a la calidad del producto final en términos de sabor, seguridad y en el desarrollo de la imagen del producto (SALMINEN et al, 2004).

Para optimizar las dos variables se aplicó el método de la superficie de respuesta, planificando un nuevo plan experimental y calculando de la forma antes explicada la respuesta (función de utilidad).

6.2.3.3.7 Matriz del diseño experimental superficie de respuesta

Tabla 23. Matriz del modelo de superficie de respuesta

Exp.	I	X ₁	X ₃	X ₁ X ₃	X ₁ ²	X ₃ ²	F.U.
1	1	-1	-1	1	1	1	0.310
2	1	1	-1	-1	1	1	0.413
3	1	-1	1	-1	1	1	0.329
4	1	1	1	1	1	1	0.466
5	1	1	0	0	1	0	0.423
6	1	-1	0	0	1	0	0.256
7	1	0	1	0	0	1	0.477
8	1	0	-1	0	0	1	0.432
9	1	0	0	0	0	0	0.687

Fuente: Autor

6.2.3.3.8 NUEVOS Coeficientes de las variables

Mediante una nueva regresión de mínimos cuadrados multivariante se obtuvieron los coeficientes de las variables y sus respectivas interacciones de orden superior para aplicar la optimización y obtener la superficie de respuesta:

Tabla 24. Coeficientes del modelo de superficie de respuesta

Coef.	b ₀	b ₁	b ₃	b ₁₃	b ₁₁	b ₃₃
	0.566	0.068	0.020	0.009	-0.166	-0.051

Fuente: Autor

6.2.3.3.9. Optimización por el método de superficie de respuesta

Queda así establecido el polinomio de superficie de respuesta y su respectiva gráfica que permite obtener las condiciones de optimalidad para el proceso de fermentación de la crema de soya.

$$Y = 0.5659 + 0.0678X_1 + 0.0195X_3 + 0.0085X_1X_3 - 0.1658X_1^2 - 0.0508X_3^2$$

Del polinomio de screening 3 se observa que la variable X_1 y X_3 actúan ambas de manera sinérgica, provocando mejora de la función de utilidad a medida que aumentan sus valores dentro del dominio experimental. Los efectos cuadráticos permiten evaluar eventuales curvaturas que permitirán definir el campo de óptimo, según se muestra en la gráfica de superficie de respuesta:

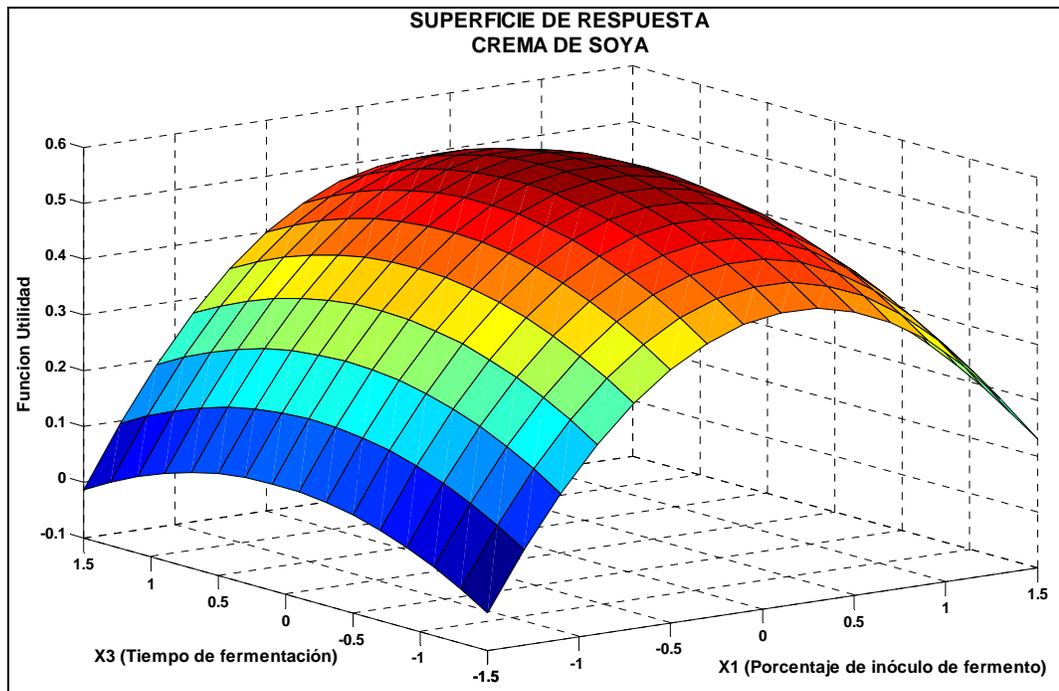


Figura 33. Superficie de respuesta proceso de fermentación

Fuente: Autor

Para obtener las condiciones que generan la máxima respuesta, a partir del polinomio de superficie de respuesta se aplicó el sistema de derivadas parciales (KRASNOV et al, 1976.), pudiendo establecer las coordenadas escaladas.

$$\frac{\partial}{\partial X_1} = 0.0678 + 0.0085X_3 - 0.3316X_1 = 0$$

$$\frac{\partial}{\partial X_3} = 0.0195 + 0.0085X_1 - 0.1016X_3 = 0$$

Resolviendo el sistema de ecuaciones se obtiene que $X_1 = 0,21$ y $X_3 = 0,216$. A partir de las coordenadas escaladas de máximo, por medio de la ecuación de escalado de variables (LEWIS et al, 1999) se obtienen las condiciones naturales de cada variable. Para el inóculo de fermento en una proporción de 0.242% y 7.1 horas para el tiempo de fermentación.

Para comprobar lo anterior se puede además utilizar el Discriminante o Hessiano (Matriz Hessiana) que se utiliza para encontrar Máximos, Mínimos y Puntos de Silla en Funciones de Varias Variables (QUIROGA, 2008) y seguir los pasos ya explicados en el capítulo 5

F.U. (Función utilidad) =

$$0,5659 + 0,0678X_1 + 0,0195X_3 + 0,0085X_1X_3 - 0,1658X_1^2 - 0,0508X_3^2$$

8. Calcular las primeras derivadas parciales

$$\frac{\partial}{\partial X_1} = 0,0678 + 0,0085X_3 - 0,3316X_1$$

$$\frac{\partial}{\partial X_3} = 0,0195 + 0,0085X_1 - 0,1016X_3$$

$$1.- 0,0678 + 0,0085X_3 - 0,3316X_1 = 0$$

$$2.- 0,0195 + 0,0085X_1 - 0,1016X_3 = 0$$

En 1 despejamos X_3 :

$$X_3 = \frac{0,3316X_1 - 0,0678}{0,0085}$$

Reemplazamos el valor de X_3 en la ecuación 2 y obtenemos el valor de X_1 :

$$0,0085X_1 = 0,1016 \left(\frac{0,3316X_1 - 0,0678}{0,0085} \right) - 0,0195$$

$$-0,0336X_1 = -7,0543 \times 10^{-3}$$

$$X_1 = 0,21$$

Reemplazamos el valor de X_1 en la ecuación 1:

$$X_3 = \frac{0,3316(0,21) - 0,0678}{0,0085}$$

$$X_3 = 0,216$$

$$f_{x_1x_1} = -0,3316$$

$$f_{x_1x_3} = 0,0085$$

$$f_{x_3x_3} = -0,1016$$

$$H_{x_1x_3} = \begin{vmatrix} f_{x_1x_1} & f_{x_1x_3} \\ f_{x_1x_3} & f_{x_3x_3} \end{vmatrix} = \begin{vmatrix} \frac{\partial^2 f}{\partial x_1^2} & \frac{\partial^2 f}{\partial x_1 \partial x_3} \\ \frac{\partial^2 f}{\partial x_1 \partial x_3} & \frac{\partial^2 f}{\partial x_3^2} \end{vmatrix}$$

$$H = \begin{vmatrix} -0,3316 & 0,0085 \\ 0,0085 & -0,1016 \end{vmatrix}$$

$$\det(H) = 0,03376$$

$f_{xx} = -0,3316 < 0$ por lo tanto la función utilidad tiene un máximo en el punto crítico
 $X_1 = 0,21$

$f_{yy} = -0,1016 < 0$ por lo tanto la función utilidad tiene un máximo en el punto crítico
 $X_3 = 0,216$

Como $\det(H) = 0,03376 > 0$ procedemos a verificar que la función no tiene punto silla en el punto crítico.

Como $\det(H) = 0,03376 > 0$ podemos resumir que la información o el criterio si es concluyente.

$$X_3 = 0,216$$

Ahora aplicamos los valores obtenidos para X_1 y X_3 para obtener el valor exacto de la variable:

Para X_1 :

$$X'' = 2 \frac{X - X_{\min}}{X_{\max} - X_{\min}} - 1$$

$$0,21 = 2 \frac{X - 0}{0,4 - 0} - 1$$

$$0,84 = 2X - 0,4$$

$$2X = 0,084 + 0,4$$

$$X = 0,242\% \text{ (Inóculo del fermento)}$$

Para X_2 :

$$X'' = 2 \frac{X - X_{\min}}{X_{\max} - X_{\min}} - 1$$

$$0,216'' = \frac{2X - 2}{11 - 1} - 1$$

$$2,16'' = 2X - 2 - 10$$

$$X = 7,1 \text{ horas}$$

Por lo tanto quedan comprobados los valores obtenidos por el método de superficie de respuesta.

CONCLUSIONES

En este trabajo se logró optimizar las condiciones de proceso para obtener una crema de soya con hidrólisis de la proteína, mejorando las características funcionales y obteniendo un grado óptimo de extracto seco.

Para alcanzar una buena hidrólisis se tiene a 0.90% de enzima y 55 minutos para el tiempo; mientras que la temperatura se mantuvo fijo a un valor de 32°C. Mientras que para el proceso de gelificación las condiciones son: 0.41% de cloruro de magnesio, 0.26% de cloruro de calcio y 81.4°C para la temperatura de gelificación. Para la fermentación las mejores condiciones se obtiene 0.242% de fermento y dejándola fermentar durante 7.1 horas.

Las condiciones de estos tres procesos permiten obtener una crema de soya de características sensoriales aceptables.

BIBLIOGRAFÍA:

AHMAD Naveed, LI Li, YANG Xiao-Quan, NING, Zheng-Xiang. and Atif, Muhammad. 2008. Improvements in the Flavour of Soy Cheese, Food Technol. Biotechnol. Pakistan. 46(3): 252-261

ANZALDÚA Antonio. 1994. La Evaluación Sensorial de los Alimentos en la Teoría y la Práctica. Editorial Acribia, S. A. España. 198 páginas.

BADUI, Salvador. 1999. Química de los alimentos. 2da Edición. Editorial Acribia. España. 648 páginas

BOX George., HUNTER, William. and HUNTER Stuart. 1978. Statistics for experimenters. An introduction to design, data analysis, and model building. John Wiley & Sons. United States. 653 páginas.

BRAVERMAN Joseph. 1980. Introducción a la bioquímica de los alimentos. Editorial Omega, SA. España. 358 páginas.

CARLSON Rolf y CARLSON Johan. 1992. Design and optimization in organic synthesis. Elsevier Science Publishers B.V. Países Bajos. 574 páginas.

CHEFTEL, Jean; CUQ, Jean. 1989. Proteínas alimentarias: bioquímica, propiedades funcionales valor nutricional modificaciones químicas. Editorial Acribia. España. 346 páginas.

CIABOTTI Saul. 2007. Desenvolvimento de um produto similar ao tofu com base na combinação do extrato de soja e soro de leite. Tese de doctor em ciência dos alimentos. Universidade Federal de Lavras. Brasil. 240 p. Pdf descargado de la página www.dominiopublico.gov.br/pesquisa. Leído el 30 de junio del 2010.

COCIO Jenny. 2006. Elaboración de Quesillo de Leche de Soya (Glycine max) con Adición de Bacterias Prebióticas (Lactobacillus casei shirota y Bifidobacterium lactis Bb12). Tesis presentada para la obtención del título de Licenciada en Ciencia de los Alimentos. Universidad Austral. 155 páginas. Chile. Pdf descargado de: <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2006/fac663e/doc/fac663e.pdf>. Leído el 30 de Junio del 2010.

CUATRECASAS, Lluís. 2001. Gestión integral de la calidad: Implantación, control y certificación. Ediciones Gestión 2000, S.A. México. 356 páginas.

DRAPER Norman y SMITH Harry. 1981. Applied regression analysis. John Wiley & Sons, Inc. United States. 709 páginas.

FAO/OMS. 1985. Informe de una Reunión consultiva conjunta FAO/OMS/UNU de expertos. Necesidades de energía y de proteínas. Suiza. . 220 páginas

FAO/WHO Report of a joint expert consultation. 1998. Vitamin and mineral requirements in human nutrition. Thailand.

FERNANDEZ, Daniel; LAGUNA, José; PINA GARZA, Enrique. 2002. Estructura y propiedades de las proteínas. Bioquímica de Laguna. Editorial El Manual Moderno. México. 749 paginas.

GABRIELSSON, Jon; LIND, Nils-Olof and LUNDSTEDT, Torbjörn. 2002 Multivariate Methods in Pharmaceutical Applications. Journal of chemometrics. Suiza. Volumen 16. páginas 141-160.

GENTA, María y ALVAREZ, Nilda. 2006 El complejo soja. Portal de la revista de Ciencias Exactas e Ingeniería, Universidad de Tucuman. Argentina. Consultado en línea: www.herrera.unt.edu.ar/revistacet. Leído el 30 de Junio del 2010.

GUTIÉRREZ Humberto y DE LA VARA Román. 2008. Análisis y diseño de experimentos. 2da Edición. Editorial McGraw-Hill. México. 571 páginas.

HENKEL John. 2000. Soybean: Health claims petitions: Soy Protein and the Reduced Risk of Certain Cancers. The Salae company. United States.

GABRIELSSON Jon, LIND Nils-Olof and LUNDSTEDT Torbjörn. 2002 JOURNAL OF CHEMOMETRICS. Volumen 16. Multivariate Methods in Pharmaceutical Applications. Suiza. páginas 141-160.

KAWAMURA, Yasuhisa; HATTORI, Norikazu. 2002. SIDS Initial Assessment Report For SIAM 15, Chemical Name: Calcium chloride. CAS Number: 10043-52-4. Sponsor Country: Japan. Tokuyama Corporation. Publicado en Boston. Contactos de los responsables: s-moriyama@tokuyama.co.jp, nhattori@tokuyama.co.jp. United States

KRASNOV Mijail, MAKARENKO Grigoriï y KISELIOV Aleksandr. 1976. Cálculo variacional. (ejemplos y problemas). Editorial Mir. Rusia. 190 páginas.

LEITHOLD Louis. 1998. El cálculo. Séptima Edición. Traducido por Antonio Eroles. Editor Harla, S.A. de C.V. México.

LEMOS, Maria. 2005. Calidad y rendimiento de la leche de Soya de la Unidad de producción de derivados de soya. Disertación en grado de Master en Ciencia de los Alimentos. Universidad Estatal Paulista Julio de Mezquita Jr. Tesis descargada de: www.cipedya.com/web. Leído el 30 de Junio del 2010.

LEWIS Gareth, MATHIEU Dieder, PHAN-TAN-LUU Roger. 1999. Pharmaceutical experimental design. Marcel Dekker, Inc. United States. 498 páginas.

LUNDSTEDT Torbjörn, SEIFERT Elisabeth, ABRAMO Lisbeth, THELIN, Bernt, NYSTRÖM Åsa, PETTERSEN Jarle, y BERGMAN Rolf. 1998. Experimental design and optimization. Chemometric Intel. Lab. Syst. Suiza. 42: 3-40.

MASSART Désiré, VANDEGINSTE, BGM. and BUYDENS, LMC. 1997. Handbook of chemometrics and qualimetrics: Part A. Elsevier Science Publishers B.V. Países Bajos.

MATEOS,-APARICIO, Ignacio. 2008. Soybean, a promising health source. Boletín de Nutrición Hospitalario. España. 23 (4): 305-312.

MEJÍAS Elizabeth, RUÍZ Adolfo, GONZÁLEZ Minnelys. 2006. Obtención de tofú de leche de soya proteolizada. Ciencia y tecnología de alimentos. Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia. Cuba. Vol. 16 (2): 41-46.

MONTGOMERY, Douglas. 2001. Design and analysis of experiments. 5ta edición. Editorial John Wiley & Sons, Inc. United States. 656 páginas.

NOEMBEREG, Elmer. 2006. Análisis de Ácido Fítico y minerales en los procesos de maceración e cocción de soya. Disertación. Grado de Master en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Universidad Estadual de Londrina, Brasil. 226pág. Pdf descargado de la página www.dominiopublico.gov.br/pesquisa. Leído 30 de junio del 2010.

PALOU, Andreu; ARBOIX, Margarita; AROLA, Lluís; BLADÉ, Cinta. Consecuencias asociadas al consumo de isoflavona. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN). 18 páginas. Documento aprobado por el Comité Científico en sesión plenaria de 27 de febrero de 2007. Consultado en www.aesan.org. Leído 30 de junio del 2010.

PAVAN, Manuela. 2003. Total and partial ranking methods in chemical sciences, Ph.D. Thesis in chemical sciences. . University of Milano-Bicocca. Italia. 277 páginas.

PRIETO, Carlos. 2007. Diseño y Optimización de un reactor de membrana discontinuo para la hidrólisis enzimática de las proteínas. Editorial de la Universidad de Granada. Tesis en Grado de Doctor. Facultad de Ciencias Químicas. Disponible en línea: <http://hera.ugr.es/tesisugr/17243543.pdf>. Leído el 20 de Septiembre del 2010.

QUIROGA, Antonia. 2008. Introducción al Cálculo II. 1era Edición. Editorial Delta publicaciones Universitarias. España. 474 páginas.

RIDNER, Egardo. 2006. Soja, propiedades nutricionales y su impacto en la salud. 1era Edición. Editorial Grupo Q S.A. Argentina. 96 páginas.

ROBINSON, David. 1991. Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos. Editorial Acribia. México. 516 páginas.

RODRÍGUEZ, Ana. 2007. Validación bioquímica y nutricional de harina de soja procesada enzimáticamente para la remoción del oligosacárido rafinosa. Disertación grado de master en ciencias. Universidad de Vicosa. Brasil. Disponible en: <ftp://ftp.bbt.ufv.br/teses/bioquimica%20agricola/2007/202480f.pdf>.

ROISINBLIT, Daniel. Consideraciones sobre la soja en la alimentación. Informe del Consejo Nacional de Coordinación de Políticas Sociales de la Presidencia de la República de Argentina. Febrero del 2003. 21 páginas.

SALMINEN Seppo, VON WRIGHT Atte. y OUWEHAND Arthur. (Editores). 2004. Lactic Acid Bacteria. Tercera Edición. Marcel Dekker, Inc. United States. 628 páginas.

SANCHO Josep, BOTA Enric y DE CASTRO, Joan. 2001. Introducción al análisis sensorial de los alimentos. Ediciones Universitat Barcelona. España. 336 páginas.

TEUBER M., GEIS A. 2006. The Genus Lactococcus, The Prokaryotes A Handbook on the Biology of Bacteria Volume 4: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria. 3era Edición. Editorial Springer. United States. 1182 pag.

TODESCHINI, Roberto; CONSONNI, Viviana y PAVAN, Manuela. 2006. La metodología della ricerca sperimentale. Milano Chemometrics and Research Group. Italia. 213 páginas.

TORREZAN, Tiberio. 2008. Efeitos do processamento à alta pressão nas propriedades funcionais da proteína de soja e suas misturas com polissacarídeos. Tesis presentada para la obtención del grado de Mestre em Tecnologia dos Alimentos. Universidad de Campiñas, Sao Paulo. Brasil. 235p. Tesis descargada de: www.cipedya.com/web. Leído el 30 de Junio del 2010.

VACLAVIK, Vickie. 1998. Fundamentos de la ciencia de los alimentos. 1era edición. Editorial Acribia. México. 485 páginas.

WHITAKER, Jhon; VORAGEN, Alphons; WONG, Dominic. 2003. Handbook of Food enzymology. Marcel Dekker, Inc. United States. 1052 páginas.

ZAIGUI, Li; HONGZHUO, Tan. 2009. Traditional Chinese foods: production and research progress. Nova Science Publishers, Inc. United States. 353 páginas.

ANEXOS

ANEXO 1

FICHA DE CATACIÓN:

Antes de realizar la evaluación sensorial de cada uno de los experimentos, se definirá una ficha de catación, en la cual cada panelista deberá registrar sus percepciones gustativas. A continuación se presenta el diseño para la posible ficha de catación:

Presentación:

Señores panelistas a continuación se va a solicitar que registre las impresiones que le presenten el siguiente producto, el cual se define como un producto untable a base de soya el cual por su aspecto se podría comparar con un queso crema de leche de vaca. Por favor se le solicita que responda de la manera más honesta posible.



FICHA DE CATACIÓN “CREMA DE SOYA”

1. Por favor introduzca los siguientes datos:

Edad		Experimento	
------	--	-------------	--

2. Señale con una X la primera impresión que le da la crema de soya:

5	Muy llamativo	
4	Llamativo	
3	Poco llamativo	
2	Nada llamativo	
1	Indiferente	

3. Levante el recipiente con la muestra de soya y gírelo para observar las tonalidades que presenta:

	Nada 0	Muy Poco 1	Poco 2	Medio 3	Bastante 4
Blanco					
Amarillo					
Rosado					

3. Con la cuchara de un movimiento circular a la muestra y acerque su nariz, que aromas percibe?

	Nada 0	Muy Poco 1	Poco 2	Medio 3	Bastante 4
Aroma agradable					
Aroma fuerte					
Aroma a cereal					
Aroma desagradable					
Aroma anormal (vinagre)					

4. **Gusto:** tome una porción de la crema de soya y manténgala en la boca por varios segundos, describa:

	Nada 0	Muy Poco 1	Poco 2	Medio 3	Bastante 4
Dulce					
Salado					
Amargo					
Acido					
Picante					
Otro (vinagre, frutal, a podrido, a tierra)					

5. **Regusto:** luego de haber comido la crema de soya, describa la sensación que le queda en su boca:

	Nada 0	Muy Poco 1	Poco 2	Medio 3	Bastante 4
Dulce					
Salado					
Amargo					
Acido					
Picante					
Otro (vinagre, frutal, a podrido, a tierra)					

6. De una calificación de cómo le pareció la crema de soya como producto final:

3	Muy Bueno	3	suma	Calificación
2	Bueno			
1	Malo			
0	Desagradable			

ANEXO 2. Ficha técnica del cultivo CHN-11



F-DVS CHN-11

Información de Producto

Versión: 2 PI-EU-ES 11-02-2008

Descripción	Cultivo mesófilo aromático, tipo LD. El cultivo produce aroma y CO ₂ . Esta gama incluye cultivos con propiedades rápidas de acidificación a bajas dosis de inoculación.		
Taxonomía	Lactococcus lactis subsp. cremoris Lactococcus lactis subsp. lactis Lactococcus lactis subsp. lactis biovar diacetylactis Leuconostoc		
Envase	No Material: 501591	Tamaño 500 G	Tipo Cartón
Propiedades Físicas	Color:	Blanco a marrón	
	Aspecto Físico:	Gránulos congelados	
Aplicación	<p>Uso El cultivo es principalmente utilizado en la fabricación de queso semi-duro tipo Continental, variedades con ojos, como p.e. Gouda, Edam, Leerdam y Samsøe.</p> <p>Dosis recomendada Como regla general 1000 g. de cultivo DVS congelados corresponden a 100 l. de lactofermento. Sin embargo, las dosis específicas deben ser determinadas experimentalmente antes de cada nueva aplicación.</p>		

ANEXO 2. Ficha de seguridad cultivo Hansen CHN-11



CHR HANSEN

SAFETY DATA SHEET

F-DVS CHN-11

Version: 3-EU/EN

Revision Date: 07-08-2009

1. IDENTIFICATION OF THE SUBSTANCE/PREPARATION AND COMPANY/UNDERTAKING

Product name: F-DVS CHN-11

Material No.: 501591

Application: For food application.

Supplier: Chr. Hansen A/S
Bøge Allé 10-12
DK-2970 Hørsholm
Tel. +45 45 74 74 74
SDS@chr-hansen.com

Emergency telephone: +45 45 74 74 74

2. HAZARDS IDENTIFICATION

The product is not classified.

Physical and Chemical Hazards: The hazardous properties of the product are considered to be limited.

Human health: Risk of local frostbite. Prolonged skin contact may cause redness and irritation.

Environment: The harmful effects of the product in the environment are considered to be limited.

3. COMPOSITION/INFORMATION ON INGREDIENTS

The product contains: bacteria, water.

Does not contain substances that must be indicated according to current regulations.
