



Universidad del Azuay

Facultad de Ciencia y Tecnología

Escuela de Ingeniería en Alimentos

*Aplicación de la biotecnología láctea de fermentos LAB para la mejora
de la producción de queso tipo fresco en la industria Nandito*

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

Autor: Marcela Patiño Zalamea

Director: Ing. Claudio Sánchez

**Cuenca, Ecuador
2011**

Dedicatoria

A mi familia: Elizabeth, Paul, Arturo, Rafael, a mi querido padre que con su esfuerzo y sacrificio me han brindado la posibilidad de adquirir mi formación profesional; y a un ser muy especial en mi corazón a quien Dios me dio una nueva oportunidad de tenerla en mi vida, mi madre, la persona que más admiro por su gran fortaleza y entrega completa hacia los demás.

Agradecimiento

Agradezco a Dios por todas las bendiciones me ha dado a lo largo de éstos años universitarios.

A mi madre Marcia y a mi padre Oswaldo, hermanos, tías, primos, amigos, compañeros por el apoyo y soporte brindado en mis momentos más difíciles.

Al Ing. Fernando Romero y a todo el personal de la industria “Nandito” por abrirme las puertas de ésta prestigiosa empresa brindándome calidez, respaldo y confianza.

A mi director de tesis, Ing. Claudio Sánchez, por su ayuda brindada para la realización de éste trabajo de graduación.

A todos los docentes de la escuela de Ingeniería de Alimentos: Ing. Cristian Rojas, Dr. Piercosímo Tripaldi, Ing. Fernanda Rosales, Dra. María Elena Cazar y todos quienes me falta por nombrar, que han sido un ejemplo de paciencia, entrega y amistad, sabiéndome guiar de la mejor manera en mis estudios académicos.

A todos los catadores por su gentil disposición en la evaluación de las muestras, ya que sin ellos este trabajo no hubiese sido posible.

Resumen

El presente trabajo plantea la aplicación de fermentos lácticos en queso fresco elaborado en Industrias “Nandito”. Se evaluó el efecto de las variables: porcentaje de inoculación, temperatura de inoculación, tiempo de recorrido del fermento, sobre las características organolépticas del queso fresco. El objetivo fue establecer las condiciones que generen la mayor aceptación sensorial.

Se aplicó un diseño experimental fraccionario 2^3 , empleando funciones multicriterio con lo cual se unificaron las diferentes sensaciones organolépticas en una sola respuesta. Mediante el método de Half Normal Plot se establecieron las variables más relevantes del modelo, identificándose como tales a la temperatura de inoculación y tiempo de recorrido del fermento. El método de la máxima pendiente fue utilizado para determinar el punto óptimo en donde se genera la mayor aceptación sensorial.

Abstract

The aim of the present work was to apply lactic ferments on the elaboration of fresh cheese at Industrias “Nandito”. The effect of ferment variables such as inoculation percentage, temperature and development time was evaluated on the organoleptic characteristics of fresh cheese. The goal was to establish the conditions for achieving the best sensorial acceptance.

An fractional experimental design 2^3 was applied, using multicriteria decision functions, joining different organoleptic appreciations in one response. By means of Half-Normal Plot Method the most relevant variables were established. The temperature of inoculation and development time are the most relevant in the model. The maximum slope method was applied to determine the optimal point where the most sensorial acceptance was generated.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Dedicatoria.....	ii
Agradecimiento.....	iii
Resumen.....	iv
Abstract.....	v
Índice de contenidos.....	vi
Índice de tablas.....	xi
Índice de figuras.....	xiii
Índice de ecuaciones.....	xiv
Índice de anexos.....	xv

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

CAPITULO I. REQUERIMIENTOS BROMATOLÓGICOS Y MICROBIOLÓGICOS DE LA LECHE CRUDA Y PASTEURIZADA PARA LA ELABORACIÓN DE QUESO FRESCO

Introducción.....	2
1.1 Concepto de calidad de leche cruda.....	2
1.1.1 Calidad composicional.....	2
1.1.1.1 Agua.....	3
1.1.1.2 Grasa.....	3
1.1.1.3 Lactosa.....	3
1.1.1.4 Proteínas.....	4
1.1.1.5 Minerales y vitaminas.....	4
1.1.2 Calidad higiénico- sanitaria.....	5
1.1.2.1 Calidad higiénica.....	5
1.1.2.1.1 Inhibidores y antibióticos.....	6
1.1.2.2 Calidad sanitaria.....	6
1.1.2.2.1 Pautas de manejo preventivo para obtener leche de calidad sanitaria.....	6

1.2 Concepto de calidad de leche pasteurizada.....	7
1.2.1 Importancia de la pasteurización de la leche.....	7
1.3 Análisis físico químicos y microbiológicos para evaluación de la calidad de leche cruda y pasteurizada de proveedores de la industria Nandito.....	7
1.4 Conclusiones.....	9

CAPITULO II. BIOTECNOLOGÍA DE LOS FERMENTOS LAB

Introducción.....	11
2.1 Definición de biotecnología.....	11
2.2 Clasificación de los fermentos lácteos.....	11
2.3 Fermento lácteo R-703.....	12
2.3.1 Funciones de los fermentos lácteos.....	13
2.3.2 Lactococcus lactis subsp.lactis.....	14
2.3.2.1 Taxonomía.....	15
2.3.3 Lactococcus lactis subsp.cremoris.....	15
2.3.3.1 Taxonomía.....	16
2.4 Presentaciones de los cultivos lácteos.....	16
2.4.1 Definición de fermentos lácteos liofilizados.....	17
2.4.1.1 Culturas de inoculación directa (DVS).....	17
2.4.2 Conservación de los fermentos.....	17
2.4.3 Preparación de fermentos en condiciones asépticas.....	17
2.5 Factores que controlan la actividad de los fermentos.....	19
2.6 Parámetros que influyen en el desarrollo de starters lácticos.....	19
2.7 Conclusiones.....	19

CAPITULO III. PROCESO TECNOLÓGICO

Introducción.....	20
3.1 Definición de queso fresco.....	20
3.1.1 Formación de la estructura básica.....	20
3.2 Elaboración de queso fresco con adición de fermentos lácticos en la industria Nandito.....	22
3.2.1 Recepción.....	22
3.2.2 Toma de muestra de leche y evaluación del proveedor.....	22

3.2.2.1	Análisis organoléptico.....	22
3.2.2.2	Prueba de alcohol.....	22
3.2.2.3	Prueba EKOMILK.....	23
3.2.2.4	Prueba de pH.....	23
3.2.3	Filtración.....	23
3.2.4	Llegada en la marmita.....	24
3.2.5	Pasteurización.....	24
3.2.6	Adición de cloruro de calcio.....	24
3.2.7	Adición de Fermento Mesófilo.....	24
3.2.8	Cuajado.....	24
3.2.9	Coagulación.....	24
3.2.10	Corte.....	25
3.2.11	Primera agitación.....	25
3.2.12	Primer desuerado.....	25
3.2.13	Segunda agitación.....	25
3.2.14	Segundo desuerado.....	25
3.2.15	Moldeado.....	25
3.2.16	Salado.....	26
3.2.17	Prensado.....	26
3.2.18	Almacenado y Empaquetado.....	26
3.3	Diagrama de flujo.....	26
3.4	Política de inocuidad de la empresa Nandito.....	27
3.5	Conclusiones.....	27

CAPITULO IV. DISEÑO EXPERIMENTAL DE MEZCLAS

Introducción.....	28
4.1 Definición del diseño experimental.....	28
4.2. Objetivos del diseño experimental.....	28
4.3 Ciclo de resolución de problemas.....	29
4.3.1 Análisis del problema.....	29
4.3.2 Planificación de los experimentos.....	29
4.3.3 Ejecución de los experimentos.....	29
4.3.4 Tratamiento estadístico de los datos.....	30
4.3.5 Análisis estadístico de los resultados.....	30

4.3.6	Regreso al paso uno.....	30
4.4	Range scaling.....	30
4.5	Funciones de utilidad.....	31
4.6	Diseño experimental factorial completo a dos niveles para tres variables.....	33
4.6.1	Matriz del diseño experimental a dos niveles y tres variables.....	34
4.7	Obtención de los coeficientes de cada variable e interacciones.....	35
4.7.1	Aplicación de Half Normal Plot.....	36
4.7.1.1	Pasos a seguirse para el desarrollo del método.....	36
4.8	Aplicación del método de la máxima pendiente para la optimización.....	36
4.9	Conclusiones.....	37

CAPITULO V. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

	Introducción.....	38
5.1	Selección de las variables directas y sus valores.....	39
5.2	Screening de las variables.....	39
5.3	Matriz de diseño experimental 2^3.....	40
5.4	Análisis de atributos sensoriales.....	40
5.5	Funciones multicriterio de utilidad.....	43
5.6	Método de mínimos cuadrados.....	47
5.7	Half normal Plot.....	48
5.8	Método de la máxima pendiente.....	50
5.9	Resultado de la aplicación de los valores de las variables obtenidas por optimización y selección de las condiciones de la máxima respuesta.....	51
5.10	Conclusiones.....	51

CAPITULO VI. DETERMINACIÓN DE BIOMASA Y ANÁLISIS DEL TIEMPO DE VIDA ÚTIL

	Introducción.....	53
6.1	Definición biomasa.....	53
6.1.1	Cálculos de biomasa.....	54
6.1.1.1	Integración de la ecuación de la recta.....	56

6.1.1.2 Datos obtenidos matemáticamente por medio de la integración de la ecuación de la recta para expresar el cambio de los moles de biomasa con respecto al tiempo.....	56
6.1.1.3 Desarrollo del problema de biomasa.....	57
6.1.2 Resultados.....	58
6.2 Definición de la vida de anaquel.....	58
6.2.1 Determinación del tiempo de vida útil.....	59
6.2.1.1 Cálculos para conocer tiempo de vida útil del queso fresco con fermento....	60
6.2.1.2 Cálculos para conocer tiempo de vida útil del queso fresco sin fermento....	61
6.3 Conclusiones.....	62
 CONCLUSIONES.....	 63
RECOMENDACIONES.....	65
BIBLIOGRAFÍA.....	66
ANEXOS.....	70

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.3.1: Promedio de análisis de la muestra A (leche cruda).....	8
Tabla 1.3.2: Promedio de análisis de muestra B (leche cruda).....	8
Tabla 1.3.3: Promedio de análisis de la leche pasteurizada.....	9
Tabla 2.2.1: Condiciones de crecimiento óptimo bacterias lácticas.....	12
Tabla 2.3.1.1: Actividad antimicrobiana de diversas cepas de BAL frente a bacterias patógenas y no patógenas.....	13
Tabla 2.3.2.1.1: Taxonomía streptococcus lactis.....	15
Tabla 2.3.3.1.1: Taxonomía streptococcus cremoris.....	16
Tabla 2.4.3.1: Hoja técnica fermento R-703.....	18
Tabla 3.2.2.3.1: Parámetros de medición EKOMILK.....	23
Tabla 3.2.2.4.1: Especificaciones PHT004TA.....	23
Tabla 4.5.1: Escala de los valores de la FU.....	33
Tabla 4.6.1: Número de experimentos para un diseño factorial 2^k	34
Tabla 4.6.1.1: Matriz del diseño experimental.....	34
Tabla 4.6.1.2: Matriz del modelo experimental.....	35
Tabla 5.1.1: Rango de las condiciones experimentales naturales de las variables.....	39
Tabla 5.2.1: Rango de las condiciones experimentales escaladas.....	39
Tabla 5.3.1: Matriz del diseño experimental 2^3	40
Tabla 5.4.1: Ficha técnica para una prueba descriptiva.....	42
Tabla 5.5.1: Funciones de utilidad para valorar atributos seleccionados.....	43
Tabla 5.5.2: Mediana de los atributos de los primeros ensayos y cálculo de la FU.....	46

Tabla 5.6.1: Matriz del modelo experimental 2 ³	47
Tabla 5.7.1: Half Normal probability plot.....	49
Tabla 5.8.1: Valor de las condiciones experimentales de las variables obtenidas por optimización.....	51
Tabla 5.9.1: Valores óptimos donde mejor interactúan las variables.....	51
Tabla 6.1.1.1: Valores de acides vs tiempo.....	54
Tabla 6.1.1.2: Determinación de gr de acido láctico producidos en el proceso.....	55
Tabla 6.1.1.3: Datos UFC vs tiempo.....	55
Tabla 6.1.1.2.1: Datos moles de biomasa vs tiempo.....	56
Tabla 6.2.1: INEN 1528 Requisitos microbiológicos del queso fresco (lotes o partidas).....	58
Tabla 6.2.1.1. Resultados análisis microbiológico queso fresco con fermento.....	60
Tabla 6.2.1.2: Resultados análisis microbiológico queso fresco sin fermento.....	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1.1.3.1: Estructura de la lactosa.....	3
Figura 2.3.1: Fermentación láctica homofermentativa.....	13
Figura 3.3.1: Diagrama de flujo queso fresco con fermento.....	26
Figura 4.5.1: Función triangular.....	32
Figura 4.5.2: Función lineal decreciente.....	32
Figura 4.5.3: Función lineal creciente.....	32
Figura 5.5.1: Funciones de utilidad para valorar el aroma.....	44
Figura 5.5.2: Funciones de utilidad para valorar el sabor.....	45
Figura 5.5.3: Funciones de utilidad para valorar la textura.....	45
Figura 6.1.1.1: Gr de ácido láctico por cada 1000cc vs tiempo.....	55
Figura 6.1.1.2: Tiempo vs UFC.....	56
Figura 6.1.1.2.1: Tiempo vs moles de biomasa.....	57

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 4.4.1: Escalado de variables.....	30
Ecuación 4.5.1: Función de utilidad.....	31
Ecuación 4.7.1: Obtención de coeficientes de cada variable.....	35
Ecuación 4.7.2: Vector respuesta.....	36
Ecuación 4.8.1 Método de la máxima pendiente para la optimización.....	37
Ecuación 5.7.1: Polinomio lineal de screening.....	48
Ecuación 6.2.1.1: Tiempo de vida de estante a cualquier temperatura.....	59

ÍNDICE DE ANEXOS

• Anexo 1:	
Cuadro 1: Análisis físico químico leche cruda A.....	70
Cuadro 2: Análisis antibióticos y prueba del alcohol de leche cruda A.....	70
Cuadro 3: Análisis organolépticos de leche cruda A.....	71
Cuadro 4: Análisis microbiológico de leche cruda A.....	72
Cuadro 5: Análisis físico químico leche cruda B.....	73
Cuadro 6: Análisis antibióticos y prueba del alcohol de leche cruda B.....	73
Cuadro 7: Análisis microbiológico de leche cruda B.....	74
Cuadro 8: Análisis organolépticos de leche cruda B.....	75
Cuadro 9: Análisis microbiológico de leche pasteurizada.....	75
Cuadro 10: Análisis físico químico de leche pasteurizada.....	76
Cuadro 11: Análisis organoléptico de leche pasteurizada.....	76
• Anexo 2:	
Figura 5.10.1: Superficie de respuesta polinomial por el método del diseño central compuesto.....	77
Figura 6.2.1.1: Escherichia Coli vs tiempo (temperatura 4°C).....	78
Figura 6.2.1.2: Escherichia Coli vs tiempo (temperatura 14°C).....	78
Figura 6.2.1.3: Staphilococcus Aureus vs tiempo (temperatura 4°C).....	79
Figura 6.2.1.4: Staphilococcus Aureus vs tiempo (temperatura 14°C).....	79
Figura 6.2.1.5: Mohos y Levaduras vs tiempo (temperatura 4°C).....	80
Figura 6.2.1.6: Mohos y Levaduras vs tiempo (temperatura 14°C).....	80

Figura 6.2.1.7: Tiempo de vida de estante de queso fresco con fermento.....	81
Figura 6.2.1.8: In (tiempo de vida de estante) vs temperatura (queso con fermento).....	81
Figura 6.2.1.9: Tiempo de vida de estante de queso fresco sin fermento.....	82
Figura 6.2.1.10: In (tiempo de vida de estante) vs temperatura (queso sin fermento).....	82
• Anexo 3:	
Resultados cataciones: Tabulación de datos.....	83

Patiño Zalamea Marcela
Trabajo de graduación
Ing. Claudio Sánchez
11 de Mayo del 2011

Aplicación de la biotecnología láctea de fermentos LAB para la mejora de la producción de queso tipo fresco en la industria Nandito

INTRODUCCIÓN

La industria Nandito, como recomendación de la FAO y debido a la poca industrialización en la zona, inicia su actividad en el año de 1972 en el cantón Girón, planteándose como principal objetivo conseguir productos inocuos y de calidad. En la actualidad, la planta se encuentra ubicada en el parque industrial y cuenta con maquinaria e infraestructura adecuada para la elaboración de queso fresco, además cuenta con la implementación de BPM y por ende personal capacitado para tal efecto. La industria produce y comercializa principalmente queso fresco, requesón y queso molido, muy conocidos y reconocidos en el mercado al cual se dirigen. El queso fresco (producto estrella) se distribuye en grandes cadenas de supermercados como son Supermaxi, Mi Comisariato, Superstock, Coralcentro ubicados en las ciudades de Quito, Guayaquil y Cuenca; también realizan su distribución a Piñas, Azogues y a distintas partes de la región azuaya. Debido a que esta empresa se halla en vías de expansión hacia nuevos mercados del país, se hace necesario y primordial la búsqueda de nuevas alternativas para brindar un producto que satisfaga las más altas exigencias tanto de su mercado actual como potencial.

Las fermentaciones lácticas son procesos microbiológicos que pueden ser aplicados en el proceso de productivo del queso fresco y éstos son de gran ayuda para optimizar la producción, incrementar la calidad, conservar el alimento por mayor tiempo, conferir a los nuevos productos aromas, sabores y texturas deseables; por lo tanto ofrece una gran oportunidad para posicionar al Queso Fresco Nandito, como un alimento inocuo y con valor añadido a la vez que se optimicen los recursos de la empresa y aporte consecuentemente con mayores ganancias a la misma.

CAPÍTULO I

REQUERIMIENTOS BROMATOLÓGICOS Y MICROBIOLÓGICOS DE LA LECHE CRUDA Y PASTEURIZADA PARA LA ELABORACIÓN DE QUESO FRESCO

Introducción

Cumplir con los requerimientos de la leche tanto físico - químico como microbiológicos son importantes en la elaboración de queso fresco aplicando fermentos lácticos, ya que el grado de conservación y contaminación de la leche puede inhibir el crecimiento del fermento, impidiendo el alcanzar las características deseadas en el queso, es por esta razón que es de fundamental importancia evaluar el estado de la leche con la que se trabaja. En este primer capítulo se da una descripción de calidad de leche, tanto cruda como pasteurizada, y se analizan los resultados de la leche de los proveedores en la industria Nandito.

1.1 Concepto de calidad de leche cruda

Leche es el producto fresco obtenido del ordeño de una o varias vacas sanas, bien alimentadas y en reposo, exento de calostro y que cumpla con las características físicas, microbiológicas e higiénicas establecidas; ya que para fabricar productos lácteos de buena calidad es indispensable contar con una materia prima de iguales características. Para ser aceptable, una leche debe tener buena conservación, estar exenta de agentes patógenos, tener buena apariencia, alto valor nutritivo y estar limpia y libre de materias extrañas y suciedades (Keating, 1964).

1.1.1 Calidad composicional

La leche está constituida por un 88% de agua y un 12% de sólidos totales (grasa, proteína, lactosa y minerales).

1.1.1.1 Agua

El agua es el componente principal de la leche, su función es actuar como disolvente de los demás componentes (cloro, sodio, potasio, lactosa, caseína, fosfatos, materia grasa).

1.1.1.2 Grasa

La grasa de la leche es una mezcla de diferentes ácidos grasos llamados triglicéridos los cuales están compuestos de un alcohol llamado glicerol y varios ácidos grasos. Cada molécula de glicerol puede combinar tres moléculas de ácido graso y estas tres no necesariamente pueden ser de la misma clase. Debemos tener en cuenta que la grasa es el componente más variable dentro de los sólidos totales de la leche. La grasa se encuentra presente en pequeños glóbulos suspendidos en agua. Cada glóbulo se encuentra rodeado de una capa de fosfolípidos, que evitan que los glóbulos se aglutinen entre sí repeliendo otros glóbulos de grasa y atrayendo agua. Siempre que esta estructura se encuentre intacta, la leche permanece como una emulsión.

1.1.1.3 Lactosa

La lactosa es la azúcar que se encuentra solamente en la leche, éste pertenece al grupo de los compuestos químicos orgánicos llamados carbohidratos. Los carbohidratos son la fuente más importante de energía en nuestra dieta, éstos se desintegran para convertirse en compuestos de alta energía los cuales pueden formar parte en las reacciones bioquímicas, donde proveen la energía necesaria. La lactosa es un disacárido compuesto por la unión de dos monosacáridos llamados glucosa y galactosa.

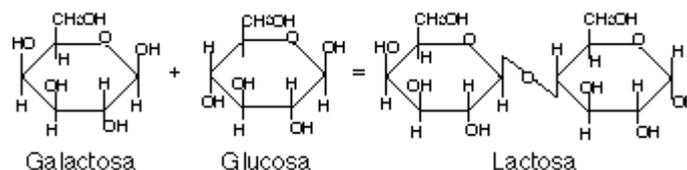


Figura 1.1.1.3.1: Estructura de la lactosa.

Fuente: ALAIS Ch., LACASA A. 1985. "Ciencia de la leche: principios de técnica lechera", Traducido por Lacasa A., Editorial Reverte, S.A., Barcelona - España.

Cuando la lactosa es atacada por bacterias ácido lácticas, éstas contienen una enzima llamada lactasa la cual ataca a la lactosa, dividiendo sus moléculas en glucosa y galactosa, luego otras enzimas ácido lácticas atacan a la glucosa y galactosa, las cuales son convertidas a través de reacciones intermedias en ácido láctico principalmente. La lactosa es el componente menos variable dentro de los sólidos que componen la leche.

1.1.1.4 Proteínas

La caseína constituye entre el 70 y el 75% de las proteínas totales de la leche. Debido a la abundancia de grupos estables de iones y sitios hidrofóbicos en la molécula de la caseína, los polímeros moleculares formados por las caseínas son muy especiales. Los polímeros son contruidos por cientos de miles de moléculas de caseína individuales con fosfato de calcio inorgánico que forman una solución coloidal, este complejo molecular se lo conoce como micelas de caseína. En el caso de la caseína k, la región que termina en nitrógeno (componentes 1 a 105) es altamente hidrofóbica y el resto, la región que termina en carbono (residuos 106 a 169), es hidrofílica. Es importante conocer que uno de los aspectos funcionales de la k-caseína es estabilizar las micelas, esto se debe a que la k-caseína está localizada principalmente en la superficie de las micelas, formando una región hidrofílica que tiene un espesor entre 5 nm y 10 nm. Debido a la presencia de esta capa de macropéptido, las micelas de caseína están altamente hidratadas, llegando a tener cerca de 2gr de agua por 1gr de caseína, y el grado al que se retiene la estructura de las micelas de caseína en su forma original depende en gran medida de la pérdida de fosfato de calcio y ésta pérdida a su vez, depende del pH en el momento en que se retira el lacto suero de la cuajada.

1.1.1.5 Minerales y vitaminas

Los minerales de la leche principalmente calcio, potasio y fósforo, constituyen cerca del 0.9% de la masa de la leche y en pequeñas cantidades se encuentran presentes hierro, yodo, cobre, manganeso y zinc. En cuanto a las vitaminas presentes en la leche, además de las liposolubles A, D, E y K, encontramos el complejo B y la vitamina C.

1.1.2 Calidad higiénico- sanitaria

1.1.2.1 Calidad higiénica

La leche sale de la ubre a una temperatura de alrededor de 37°C y contiene una cierta cantidad original de bactericidas que la protegen contra la acción de los microorganismos durante un periodo inicial, pero debe ser protegida contra infecciones tan pronto como abandone la ubre; sin embargo, a pesar de todas las precauciones no es posible excluir completamente las bacterias de la leche, ya que es un excelente medio de crecimiento para éstas, debido a que contiene todos los nutrientes que ellas necesitan para reproducirse; entonces a menos que la leche sea enfriada a una temperatura de 4°C, ésta será rápidamente atacada por microorganismos. A esta temperatura el nivel de actividad de los microorganismos es muy bajo, pero los microorganismos comenzarán a multiplicarse nuevamente si la temperatura sube durante el almacenaje. Por lo tanto es importante mantener la leche bien enfriada.

Ciertos tipos de microorganismos, conocidos como psicrófilos, pueden crecer y reproducirse a temperaturas de bajo 7°C. Estos están principalmente en el suelo y agua, así es que es importante que el área de trabajo, equipos y utensilios estén limpios y desinfectados así como también que el agua empleada para la limpieza sea de calidad bacteriológica.

Es importante conocer que las bacterias psicrófilas crecen en la leche almacenada sin procesar a una temperatura de 4°C después de un período de climatización de 48 – 72 horas, lo que acarrea problemas de descomposición de grasa y proteína y la leche pierde sabores disminuyendo la calidad de los productos que se hagan con ésta; por lo tanto, la leche utilizada para la fabricación de productos debe ser lo más fresca posible.

Las fuentes de contaminación generales son:

- a) Microorganismos provenientes del interior de la glándula mamaria, cuando se presentan cuadros de mastitis.
- b) Microorganismos provenientes del exterior del animal, que constituyen por lo general la principal fuente de contaminación de la leche.

1.1.2.1.1 Inhibidores y antibióticos

Se entiende por inhibidor a toda sustancia ajena al proceso de secreción de la leche que frena el desarrollo bacteriano, produciendo por lo tanto perjuicios en la industria al no permitir el normal desarrollo de los fermentos. Los inhibidores más comunes son: cloro, agua oxigenada e iodóforos.

Para evitar la presencia involuntaria de éstos en la leche, es importante eliminar completamente desinfectantes y detergentes utilizados en el lavado y desinfección del equipo de ordeño y de tanques de almacenamiento y de tarros lecheros.

La presencia de antibióticos no sólo se debe a tratamientos intramamarios, sino también a tratamientos por vía oral o inyectable que se apliquen a la vaca de la cual se obtiene la leche. Debido al perjuicio que estos presentan para la industria y para la misma salud humana, ya que algunos de ellos no son destruidos en el proceso de pasteurización, es imprescindible el descarte de la leche de animales tratados por el período que indique el producto o por indicación veterinaria.

Es importante saber que los principales efectos provocados por la presencia de antibióticos en los procesos industriales para la elaboración de queso y productos fermentados son:

Demora en la acidificación, demora en la coagulación, coagulación deficiente, disminución de la retención de agua, desarrollo de microorganismos indeseables, alteración de las características normales del producto (cuerpo débil, textura blanda, sabor amargo).

1.1.2.2 Calidad sanitaria

Para lograr una buena calidad sanitaria es imprescindible el adecuado control de la mastitis subclínica, así como mantener el ganado libre de brucelosis, tuberculosis, y participar de los planes de control de fiebre aftosa.

1.1.2.2.1 Pautas de manejo preventivo para obtener leche de calidad sanitaria

- Mantener pezones sin lesiones ni úlceras (calidad del sellador).
- Control de las moscas.
- Manejar el grupo de vacas mastíticas bajo estricto control.

- Realizar una adecuada rutina de ordeño.
- Realizar un correcto lavado del equipo de ordeño.

1.2 Concepto de calidad de leche pasteurizada

1.2.1 Importancia de la pasteurización de la leche

El principio fundamental en la industria alimentaria es que los alimentos no representen un riesgo para la salud del público consumidor. Por esta razón se utiliza la pasteurización como un tratamiento térmico diseñado para eliminar todos los microorganismos patógenos, que implican un riesgo para la salud humana, mediante el empleo adecuado de calor, procurando alterar lo menos posible el estado físico y el equilibrio químico de sus componentes.

Hay dos métodos para pasteurizar la leche. El primero consiste en calentar la leche a 65°C, durante 25 a 30 minutos y el otro en calentarla durante 15 segundos a 70°C para luego ser enfriada rápidamente. Ambos tratamientos son equivalentes en cuanto a su capacidad de destrucción total de microorganismos patógenos debido al shock térmico que se aplica.

Aún tratándose de quesos con bajo contenido de humedad y elaborados con fermentos lácticos, la pasteurización mal controlada, el uso de equipo de pasteurización en condiciones inapropiadas y la contaminación post-elaboración pueden causar riesgos severos para el público consumidor (Zottola, y Smith, 1991).

1.3 Análisis físico químicos y microbiológicos para evaluación de la calidad de leche cruda y pasteurizada de proveedores de la industria Nandito

Debido a que el análisis físico químico, microbiológico, y organoléptico, tanto de la materia prima como de la leche pasteurizada, es un factor fundamental para evitar defectos durante la inoculación de fermentos y así para obtener un queso de calidad, se procedió a analizar muestras de leche procedentes de dos proveedores principales de la empresa Nandito. El primer proveedor conocido como proveedor A realiza la entrega de la leche a las 10:00 am, la misma es procesada para fabricar un lote de producción; mientras que el segundo proveedor conocido como el proveedor B

realiza la entrega de la leche a las 8:00am con la cual se procede a elaborar otro lote de producción.

De cada proveedor principal A y B, se procedió a realizar los análisis tanto de leche cruda como pasteurizada y se verificó su calidad según las normas INEN 9:2003 y 10:2003. Obteniéndose los siguientes resultados promedio:

Promedio de análisis de la muestra A (leche cruda)				
Componente	Unidad	Muestra 1A	Muestra 2A	Muestra 4A
Grasa (1)	%m/m	3,72	3,57	3,7
SN Grasos (1)	%m/m	8,59	8,52	8,59
S.totales (1)	%m/m	12,33	11,95	12,29
Densidad (1)	gr/cc	1,028	1,029	1,029
Agua (punto crioscópico)(1)		-0,52	-0,51	-0,52
Proteína (1)	%m/m	3,24	3,23	3,24
Ph (1)		6,43	6,45	6,44
Acidez (1)	°D	18,8	18,5	18,5
Antibióticos (2)	ug/l	0	0	0
Prueba del Alcohol (2)		negativo	negativo	negativo
Color (3)		caraterístico	caraterístico	caraterístico
Olor (3)		ligeremente ácido	caraterístico	caraterístico
Aspecto (3)		caraterístico	caraterístico	caraterístico
Microorganismos aerobios mesófilos (4)	UFC/cm ³	Desde 5xE5 hasta 1,5E5	Desde 1,5xE6 hasta 5E6	Desde 1,5xE6 hasta 5E6
Bacterias Totales (4)	UFC/cm ³	2,00E+08	----	2,00E+08

Tabla 1.3.1: Promedio de análisis de la muestra A (leche cruda).

(1) Cuadro 1: Análisis físico químico leche cruda A. pag 70

(2) Cuadro 2: Análisis antibióticos y prueba del alcohol de leche cruda A. pag 70

(3) Cuadro 3: Análisis organolépticos de leche cruda A. pag 71

(4) Cuadro 4: Análisis microbiológico de leche cruda A. pag 72

Promedio de análisis de la muestra B (leche cruda)				
Componente	Unidad	Muestra 1B	Muestra 2B	Muestra 3B
Grasa (1)	%m/m	3,57	3,88	3,84
SN Grasos (1)	%m/m	8,72	8,72	8,74
S.totales (1)	%m/m	12,29	12,61	12,58
Densidad (1)	gr/cc	1,029	1,029	1,029
Agua (punto crioscópico)(1)		-0,536	-0,535	-0,536
Proteína (1)	%m/m	3,29	3,29	3,3
Ph (1)		6,48	6,49	6,5
Acidez (1)	°D	16	15,8	16
Antibióticos (2)	ug/l	0	0	0
Prueba del Alcohol (2)		negativo	negativo	negativo
Color (3)		caraterístico	caraterístico	caraterístico
Olor (3)		caraterístico	caraterístico	caraterístico
Aspecto (3)		caraterístico	caraterístico	caraterístico
Microorganismos aerobios mesófilos (4)	UFC/cm ³	Desde 5xE5 hasta 1,5E5	Desde 5xE5 hasta 1,5E5	Desde 5xE5 hasta 1,5E5
Bacterias Totales (4)	UFC/cm ³	----	4,00E+05	2,00E+05

Tabla 1.3.2: Promedio de análisis de muestra B (leche cruda).

- (1) Cuadro 5: Análisis físico químico leche cruda B. pag 73
- (2) Cuadro 6: Análisis antibióticos y prueba del alcohol de leche cruda B. pag 73
- (3) Cuadro 7: Análisis organolépticos de leche cruda B. pag 74
- (4) Cuadro 8: Análisis microbiológico de leche cruda B. pag75

Promedio de análisis de la leche pasteurizada		
Componente	Unidad	Muestra
Grasa (1)	%m/m	3,7
SN Grasos (1)	%m/m	8,52
S.totales (1)	%m/m	12,22
Densidad (1)	gr/cc	28,24
Agua (punto crioscópico)(1)		-0,533
Proteína (1)	%m/m	3,21
Ph (1)		6,43
Acidez (1)	°D	16
Color (2)		carateristico
Olor (2)		carateristico
Aspecto (2)		carateristico
Bacterias Totales (3)	UFC/cm3	1,00E+04

Tabla 1.3.3: Promedio de análisis de la leche pasteurizada.

- (1) Cuadro 10: Análisis físico químico de leche pasteurizada. pag 76
- (2) Cuadro 11: Análisis organoléptico de leche pasteurizada. pag 76
- (3) Cuadro 9: Análisis microbiológico leche pasteurizada. pag 75

1.4 Conclusiones

Se analizó la leche del proveedor B tomando las muestras 1B, 2B, 3B; obteniéndose un promedio de grasa de 3.57, 3.88, 3.84 % m/m (Tabla 1.3.2) respectivamente, con un promedio de 3.76% de grasa que es mayor en comparación con la media obtenida del proveedor de leche A (3,66%) (Tabla 1.3.1); de la misma forma el promedio de proteína de la leche 1B, 2B, 3B es de 3.29, 3.29, 3.30 % m/m (Tabla 1.3.2) respectivamente, del cual se calcula un promedio de 3.29% de proteína que es mucho mayor a la media obtenida con el lote de leche A (3,23%) (Tabla 1.3.1); por lo que se verifica que el lote de leche B presenta mejores características físico químicas que el lote de leche A.

Con respecto a la evaluación sensorial, el lote B se mantuvo con características organolépticas óptimas. Así mismo, las muestras del lote B no presentaron reacción alguna a la prueba de antibióticos por lo tanto se considera que la leche no presenta adulteración con respecto a este factor.

Al culminar los análisis de las muestras de leche B se evaluó la calidad microbiológica de las muestras que presentaron mejores características físico-químicas, realizándose análisis de bacterias totales y verificándose si los resultados eran correctos según la norma INEN 9:2003.

Una vez verificada la leche que mejor se adapte al proceso de elaboración de queso fresco con fermentos, se realizó el análisis de la leche pasteurizada de éste mismo proveedor.

Los resultados de los análisis de la leche pasteurizada B (tabla 1.3.3) son lo óptimos basándose en la NTE INEN 10:2003 Tercera revisión 2003-01 para realizar el proceso de adición de fermento, de tal manera que no represente un riesgo para el desarrollo del mismo.

CAPÍTULO II

BIOTECNOLOGÍA DE LOS FERMENTOS LAB

Introducción

En este capítulo se describe las características y funciones de los fermentos lácticos dando importancia a las cepas (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*) que contiene el fermento liofilizado R-703, el mismo que será aplicado en la elaboración de queso fresco. Se describe también las condiciones en las que el fermento se desarrolla de manera óptima para obtener los resultados deseados, así como también su forma de preparación, conservación y la correcta aplicación del mismo.

2.1 Definición de biotecnología

La Biotecnología es el empleo de organismos vivos para la obtención de un bien o servicio útil para el hombre, que se basa en la capacidad fermentativa de ciertos microorganismos.

2.2 Clasificación de los fermentos lácteos

Los cultivos bacterianos conocidos también como fermentos o starters, se utilizan en la elaboración de productos lácteos acidificados. Éstos se pueden clasificar de la siguiente manera:

- a) De acuerdo a la temperatura óptima de crecimiento:
 - Bacterias mesófilas.-Con unas temperaturas óptimas de crecimiento de 20 a 30°C.
 - Bacterias termófilas.-Con unas temperaturas óptimas de crecimiento de 40 a 45°C
- b) De acuerdo al contenido de cepas:
 - Simple cepa.- Conteniendo una única cepa de bacterias.
 - Múltiple cepa.- Mezcla de varias cepas, cada una de ellas con sus propios efectos específicos.

c) Temperatura óptima de crecimiento y tolerancia a la sal.

Las características bacterianas como temperatura óptima de crecimiento y tolerancia a la sal son muy importantes en la composición del cultivo. El objetivo de utilizar mezclas de cepas es producir el resultado deseado en simbiosis, sin que tenga lugar competencia de unas con otras, en este sentido sus características han de ser complementarias.

Bacteria	Crecimiento óptimo temp. en °C	Tolerancia máxima a la sal para crecimiento en %	Formación de ácido fermento %	Ácido cítrico fermento
Str. Lactis	Cerca de 30	4- 6.5	0.8- 1	-
Str. Cremoris	25 a 30	4	0.8- 1	-

Tabla 2.2.1: Condiciones de crecimiento óptimo bacterias lácticas.

Fuente: GÉOSTA M., LÓPEZ A. 2003. “Manual de industrias lácteas”, Traducido por Antonio López Gómez., Editorial Mundi- Prensa Libros, S.A., Madrid - España.

2.3 Fermento lácteo R-703

El fermento R-703 consta de cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, estos cultivos son mesófilos homofermentativos tipo L (el ácido láctico tiene un carbono asimétrico lo cual da lugar a actividad óptica, donde existen dos isómeros ópticos el D(-) láctico y el L(+) láctico; la configuración L(+) es metabolizada por el organismo humano). El fermento se añade al producto y se lo deja crecer en él bajo condiciones controladas. La degradación de la lactosa para la producción de ácido láctico por la vía Embden-Meyer (Figura 2.3.1), es la principal función de los cultivos y empieza cuando ésta es absorbida y fosforilada por las cepas de *L. lactis*. La Lactosa-6-fosfato es posteriormente hidrolizada por la enzima fosfo-β-galactosidasa produciendo glucosa y galactosa-6-fosfato. Estos metabolitos intermedios son luego metabolizados vía glucólisis a triosas fosfato que finalmente son transformadas en piruvato y lactato, precursor de ácido láctico (De Vos y Hugenholtz, 2004).

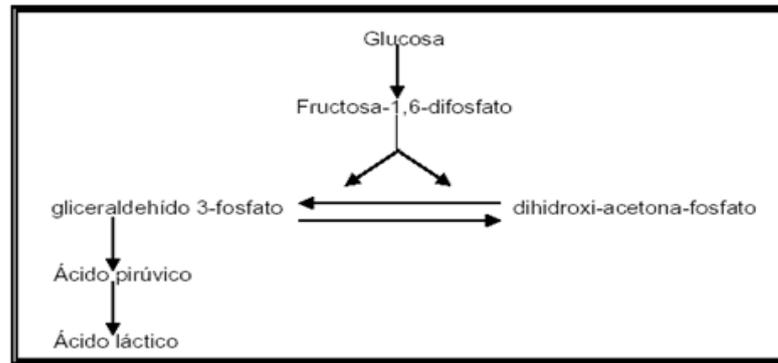


Figura 2.3.1: Fermentación láctica homofermentativa.

Fuente: LARPENT J.P. 1995. “Las Fermentaciones alimentarias”, Volumen 2, Microbiología Alimentaria, Editorial Acribia S.A., Zaragoza - España.

2.3.1 Funciones de los fermentos lácteos

Junto con la producción de acidez los cultivos lácteos actúan de la siguiente manera:

a- Protegen al queso, ya que impiden la competencia creando el medio inadecuado para el crecimiento de bacterias contaminantes.- La síntesis de bacteriocinas (nisina y diplococcina) y ácido láctico, y la tolerancia de las BAL a este ácido orgánico, evita que crezcan microorganismos patógenos ya que disminuye el pH a 5,0-5,2.

Cepa de BAL	Microorganismo antagonista
Lactobacillus helveticus	E. coli, S. aureus, St. pneumoniae, B.mycooides, B. subtilis, B. cereus.
Lactococcus lactis subsp lactis	Micrococcus flavus, Salmonella paratyphi A, Ps.aeruginosa, S.
Lactobacillus paracasei subsp. paracasei	S. aureus.
Lactobacillus acidophilus	Cl. sporogenes

Tabla 2.3.1.1: Actividad antimicrobiana de diversas cepas de BAL frente a bacterias patógenas y no patógenas.

Fuente: LARPENT J.P. 1995. “Las Fermentaciones alimentarias”, Volumen 2, Microbiología Alimentaria, Editorial Acribia S.A., Zaragoza - España.

b- Inciden en la textura, el cuerpo del queso y sabor.- Debido a que disminuye el pH le confiere sabor ácido al queso, además libera enzimas para la proteólisis que es un proceso durante la maduración que interviene en el sabor, aspecto y la textura; y la

lipólisis en donde los ácidos grasos liberados y sus productos de transformación, influyen en el aroma y sabor del queso.

c- Con el desarrollo de la acidez promueven la acción del cuajo.- La disminución del pH causa la disolución del fosfato coloidal y un aumento de la actividad de Ca^{++} . Lo que permite el acercamiento entre sí de las micelas modificadas por el cuajo y facilita la fase de agregación de las micelas para formar un gel.

d- Promueven la sinéresis.- En la leche, las micelas de caseína contienen cerca de 2gr de agua por gramo de caseína. El grado al que se retiene la estructura de las micelas de caseína en su forma original depende en gran medida de la pérdida de fosfato de calcio, y ésta pérdida a su vez, depende del pH en el momento en que se retira el lactosuero de la cuajada. Por ésta razón tratándose de quesos una de las maneras más importantes para eliminar agua consiste en disminuir el pH de la cuajada, a través de la producción de ácido láctico.

2.3.2 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

Lactococcus lactis es una bacteria gram positiva utilizada ampliamente para la producción de queso. El *Lactococcus lactis* son cocos que se agrupan en pares y cadenas cortas, y en función de las condiciones de crecimiento aparece típicamente ovoides con 0,5 a 1,5 micras de longitud. Además es un microorganismo mesófilo que tiene un metabolismo homo- fermentativo y se han dedicado a producir exclusivamente L (+) ácido láctico en gran cantidad, de la misma forma es capaz de producir algunas sustancias antibacterianas conocidas en forma genérica como bacteriocinas, entre las cuales destacan la nisina y la diplococcina, por lo que puede ser utilizado tecnológicamente como biopreservador, controlando el crecimiento de bacterias patógenas como el *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 e incluso algunas especies del género *Clostridium*, los cuales son responsables de serios problemas de conservación en diversos productos lácteos.

2.3.2.1 Taxonomía

Nombre científico	Lactococcus lactis subsp. lactis
Sinónimo	Streptococcus lactis
Otros nombres	› "Lactococcus lactis subsp. diacetylactis (sic)" (Garvie and Farrow 1982) Schleifer et al. 1986 › "Streptococcus diacetylactis" Matuszewski et al. 1936 › Lactobacillus xylosus › Lactobacillus xylosus Kitahara 1938 (Approved Lists 1980) › Lactococcus lactis (SUBSP. LACTIS)
Linaje	› organismo celular › Bacteria › Firmicutes › Bacilo › Lactobacilos › Streptococcus › Lactococcus › Lactococcus lactis
Temp. Óptima	37 °C

Tabla 2.3.2.1.1: Taxonomía streptococcus lactis.

Fuente: RED DE REVISTAS CIENTÍFICAS DE AMÉRICA LATINA Y DEL CARIBE, ESPAÑA Y PORTUGAL. 2005. Producción Biotecnológica de ácido láctico-Estado del arte, Ciencia y Tecnología alimentaria, Sociedad Mexicana de Nutrición y Tecnología de Alimentos, Reynosa, México, Diciembre, vol5, número 001. Disponible en internet: www.altaga.org/cyta. ISSN 1135-8122.

2.3.3 Lactococcus lactis subsp. cremoris

El *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* puede ser distinguido de otras cepas por ciertas características fenotípicas incluyendo una menor temperatura óptima para su crecimiento, una inhabilidad de crecer ya sea en pH de 9.2 o en presencia de 4% de NaCl. Las cepas de *L. lactis* subsp. *cremoris* tienen alta actividad de O- galactosidasa. Las cepas de *L. lactis* subsp. *cremoris* son utilizadas para resolver problemas industriales, incluyendo sabores indeseables que se encuentran en los productos lácteos, insuficiente desarrollo de acidez durante la fermentación y frecuentes fracasos en los cultivos resultantes por una infección viral.

2.3.3.1 Taxonomía

Nombre científico	Lactococcus lactis subsp. cremoris
Sinónimo	Streptococcus cremoris
Otros nombres	<ul style="list-style-type: none"> › "Streptococcus hollandicus" Scholl 1891 › "Streptococcus lactis B" Ayers et al. 1924 › Lactobacillus cremoris › Lactococcus cremoris › Lactococcus lactis (SUBSP. CREMORIS)
Linaje	<ul style="list-style-type: none"> › organismo celular › Bacteria › Firmicutes › Bacilo › Lactobacilos › Streptococcus › Lactococcus › Lactococcus lactis
Temp. Óptima	37 °C

Tabla 2.3.3.1.1: Taxonomía streptococcus cremoris.

Fuente: RED DE REVISTAS CIENTÍFICAS DE AMÉRICA LATINA Y DEL CARIBE, ESPAÑA Y PORTUGAL. 2005. Producción Biotecnológica de ácido láctico-Estado del arte, Ciencia y Tecnología alimentaria, Sociedad Mexicana de Nutrición y Tecnología de Alimentos, Reynosa, México, Diciembre, vol5, número 001. Disponible en internet: www.altaga.org/cyta. ISSN 1135-8122.

2.4 Presentaciones de los cultivos lácteos

Los cultivos lácteos pueden venir en distintas presentaciones como:

- a) Líquidos.- Para la propagación de un cultivo madre.
- b) Liofilizados.- Como un concentrado de cultivos en forma de polvo, para la propagación de cultivo industrial.
- c) Congelados.- como un concentrado de cultivos para la propagación como cultivo industrial.
- d) Congelados.- Como cultivos super concentrados en forma muy soluble, para inoculación directa del producto.

2.4.1 Definición de fermentos lácteos liofilizados

Son fermentos obtenidos de fuentes primarias (derivados lácteos como yogurt, quesos, leches fermentadas, etc.) que son sometidos a estudios e investigación y mediante sofisticados procesos de producción, se seleccionan las cepas; se multiplican, centrifugan se concentran, se adiciona un crioprotector, se congelan y finalmente se procede a su deshidratado por sublimación (liofilización), envasado y distribución.

Los Cultivos Lácticos Liofilizados utilizados como inóculo directo, son una gran ventaja evidente, en particular en las industrias que, dada la elevada cantidad de leche procesada diariamente, o la falta de equipos idóneos dedicados a la preparación de fermentos intermedios, son una solución tecnológica de rápido y fácil empleo; sólo necesitan ser previamente disuelto en la leche antes de ser agregado a la tina.

2.4.1.1 Cultivos de inoculación directa (DVS)

Los cultivos DVS son bacterias liofilizadas que pueden añadirse directamente a la leche. Se requiere un tiempo de maduración de 30 minutos a 1 hora. Los cultivos DVS se presentan en paquetes de lámina de aluminio de 50U, 200U y 500U. La cultura de 50U se añade a 500lt de leche y equivale a una tasa de 0,001%. En el queso se puede requerir una tasa adicional de 0,0005%.

2.4.2 Conservación de los fermentos

Los fermentos liofilizados se pueden transportar a temperaturas de 20°C y durante un tiempo de 10 días sin disminuir su vida útil inicial y deberán ser almacenados a la temperatura recomendada tras su llegada a las instalaciones del comprador.

2.4.3 Preparación de fermentos en condiciones asépticas

Las recomendaciones dadas por los suministradores de los diferentes tipos de fermentos se deben seguir cuidadosamente para obtener los resultados óptimos.

FD- DVS pHage control R-703 (Culture Series)

Descripción	Cultivo mesofílico homofermentativo, tipo O. este cultivo contiene cepas de lactococcus lactis subsp.cremoris y lactococcus lactis subsp. Lactis seleccionados por su resistencia y habilidad de producir rápidamente ácido láctico y no producir CO ₂ . Estos cultivos están empacados en una forma congelada y seca
Aplicación	Este cultivo se aplica primordialmente a la producción de quesos con una textura compacta. este cultivo se puede usar también con la adición de otros cultivos lácticos
Almacenado y shelf life	Los cultivos secos congelados deben ser almacenados a una temperatura de -18°C o menos. Si el cultivo seco congelado se almacena a esta temperatura o menos su shelf life es de 24 meses y a +5°C su shelf life es de 6 semanas.
Instrucciones para el uso	Retire el cultivo del congelador antes de usar. Saníctice la parte superior del empaque. Abra el empaque y vierta el contenido en la leche pasteurizada y agite suavemente 10 a 15 min para distribuir el cultivo regularmente
Dosis	La dosis recomendada de los cultivos secos congelados en litros

Porcentaje de inoculación del DVS	Cantidad de leche a ser inoculada			
	1,000l	5,000l	10,000l	15,000l
1000U/5000l	200U	1000U	2000U	3000U
500U/5000l	100U	500U	1000U	1500U
250U/5000l	50U	125U	500U	750U

Sensibilidad a la Sal	R-703	
50% de inhibición	5,0% de ClNa	
100% de inhibición	>6% de ClNa	
Rango de temperatura	Min	Max
	22°C	40°C

Tabla 2.4.3.1: Hoja técnica fermento R-703.

Fuente: Chr.Hansen ABr/R-703 series-P/ okt20001/ 1:5.

2.5 Factores que controlan la actividad de los fermentos

- a) Su capacidad de producir ácido láctico.
- b) La calidad de la leche donde se aplican.
- c) Ausencia de sustancias inhibidoras como antibióticos, inmunoglobulinas.
- d) Ausencia de bacteriófagos.
- e) La temperatura de maduración de la leche y/o cuajada,
- f) Cantidad de cultivo añadido a la leche.

2.6 Parámetros que influyen en el desarrollo de starters lácticos

- a) El índice de acidez/pH del queso influye en la coagulación y en el corte del coágulo del queso, esto tiene un impacto directo en la textura y el flavor por la proteólisis.
- b) La actividad acidificante influye en la sinéresis y en la sequedad, y como consecuencia también en la textura.
- c) Nivel de Acidificación/pH mínimo, influye en la textura y flavor al igual que en el color, directa o indirectamente a través de la actividad enzimática.

2.7 Conclusiones

En este capítulo se puede apreciar que el fermento óptimo para aplicarse en la elaboración de queso fresco, es el fermento liofilizado R-703 debido a su fácil manejo y sobre todo a las cepas de las que éste consta, las cuales son las más adecuadas para conseguir las características deseadas en el queso fresco a ser aplicado. En base a la bibliografía, se ha determinado que la temperatura óptima para el correcto desarrollo del fermento está entre un rango de 30 a 37 °C. Un factor importante a tomar en cuenta, es el cuidado que se debe tener con el porcentaje de sal que se adiciona, ya que afecta en gran manera al desarrollo de la cepa de *Lactococcus lactis subsp.cremoris* por lo que es recomendable no exceder de un 4% de sal. El porcentaje de inóculo del fermento R-703 estará entre de 0,0008% y 0,0012% ya que en estos rangos se puede lograr un buen desarrollo del fermento para conseguir las características deseadas de acidificación. El tiempo adecuado para el desarrollo del fermento está entre 30 a 1h.

CAPITULO III

PROCESO TECNOLÓGICO

Introducción

En este tercer capítulo, se describe el proceso tecnológico que se lleva a cabo en la industria Nandito, con la finalidad de dar a conocer los mecanismos y técnicas que se utilizan para fabricar el queso fresco, y que dará la posibilidad de aplicar fermentos en su proceso de elaboración.

3.1 Definición de queso fresco

El queso fresco es el producto obtenido por coagulación de la leche pasteurizada, integral o parcialmente descremada, constituido esencialmente por caseína de la leche en forma de gel más o menos deshidratado, que retiene un porcentaje de la materia de grasa, según el caso, un poco de lactosa en forma de ácido láctico y una fracción variable de sustancias minerales.

Es un queso que está listo para el consumo después de la fabricación y no será sometido a ningún cambio físico o químico adicional (Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1528).

3.1.1 Formación de la estructura básica

El paso inicial en la fabricación de quesos es la gelación o coagulación de la caseína, inducida mediante la acción combinada de enzimas proteolíticas (cuajos de distintos tipos) y calcio. Este proceso se divide en tres fases: la fase primaria o enzimática y la fase secundaria o de agregación y la fase terciaria conocida como sinéresis o expulsión de lactosuero.

La primera fase consiste de una reacción altamente específica entre el cuajo y la k-caseína que se encuentra principalmente en la superficie de las micelas de caseína. Hay un corte proteolítico en el enlace $\text{Phe}_{105}\text{-Met}_{106}$ de la k-caseína, que genera dos péptidos con propiedades muy distintas. El glicomacropéptido formado por la cadena entre los residuos de aminoácidos 106 a 169 es hidrofílico y soluble. Este fragmento, que representa cerca del 4% de la caseína total (Callanan, 1991), pasa a formar parte del lactosuero y por tanto no contribuye al rendimiento. El otro fragmento, formado por la cadena entre los componentes 1 a 105, se denomina para-k-caseína, es altamente hidrofóbico y permanece enlazado a las micelas.

El efecto inicial de esta reacción es una reducción drástica en la carga eléctrica negativa de la superficie de las micelas, que permite el acercamiento entre sí de las micelas modificadas y facilita así la segunda fase de agregación de las micelas para formar un gel, en la que el calcio (Ca^{++}) juega un papel importante como acelerador del proceso.

De ahí en adelante, la fabricación de queso se puede considerar básicamente como la eliminación de agua, o concentración de sólidos, a partir del gel o coágulo formado mediante la acción del cuajo. En este proceso de deshidratación, la caseína y la materia grasa de la leche se concentran por un factor cercano a 8 - 10 veces, dependiendo del contenido de humedad en el queso.

En la leche, las micelas de caseína contienen cerca de 2 gramos de agua por gramo de caseína. El grado al que se retiene la estructura de las micelas de caseína en su forma original depende en gran medida de la pérdida de fosfato de calcio y esta pérdida, a su vez, depende del pH en el momento en el que se retira el lactosuero de la cuajada.

3.2 Elaboración de queso fresco con adición de fermentos lácticos en la industria Nandito

3.2.1 Recepción

Esta operación es realizada por personal capacitado, en el área de recepción que se encuentra separada del área de procesamiento, utilizando equipos y utensilios exclusivos para este fin, bajo las condiciones higiénicas sanitarias y precauciones necesarias.

3.2.2 Toma de muestra de leche y evaluación del proveedor

Está a cargo de los responsables de calidad y se basa en el análisis de parámetros tales como: proteínas, grasas, sólidos totales, densidad, punto de congelamiento, acidez, cantidad de lactosa, temperatura de la leche.

Cada lote de materia prima es analizado siguiendo un plan de muestreo y se desarrolla en las siguientes fases cronológicas:

3.2.2.1 Análisis organoléptico.- A partir del cual se evalúa las características de la materia prima tales como:

- Color.- Que debe ser blanco opalescente o ligeramente amarillento.
- Olor.- Que debe ser suave, lácteo característico, libre de olores extraños.
- Aspecto.- Que debe ser homogéneo, libre de olores extraños.

De ésta labor está encargado el responsable de control de calidad.

3.2.2.2 Prueba de alcohol.- Esta prueba la realiza el responsable de control de calidad de la siguiente manera:

- Verter 2cc de la muestra de leche en los tubos de ensayo.
- Adicionar alcohol industrial de 70 ° en una proporción 1/1.
- Dejar en reposo por 1 minuto.
- Agitar.
- Verificar si la leche presenta grumos en las paredes, si es así se rechaza caso contrario se procede a realizar los siguientes análisis.

3.2.2.3 Prueba EKOMILK

Se utiliza el analizador ultrasónico de leche EKOMILK, que está diseñado para un análisis rápido y económico de los contenidos de grasa, sólidos no grasos de leche, proteína, densidad de la leche y agua agregada en la leche.

Parámetros de medición:

Grasa	de 0,5% a 12% con exactitud $\pm 0,1\%$
Sólidos no grasos	de 6% a 12% con exactitud $\pm 0,2\%$
Densidad de la leche	de 1,0260 a 1,0330 g/cm ³ \pm a 0,0005 g/cm ³
Proteína	de 2% a 6% con exactitud $\pm 0,2\%$
Punto de congelamiento	de 0 a -1.000 °C con exactitud $\pm 0,015$ °C
Agua agregada a la leche	de 0% a 6% con exactitud $\pm 5\%$

Tabla 3.2.2.3.1: Parámetros de medición EKOMILK

Fuente: Analizadores para leche Ekomilk. Pag 32.

3.2.2.4 Prueba de pH

Una vez obtenidos los resultados del ekomilk, se procede a realizar la prueba de pH y temperatura utilizando el equipo PHT004TA.

Especificaciones del equipo.

	Rangos	Resolución	Exactitud
pH	0 – 14.00 pH	0,01pH	$\pm 0,02$ pH
temperatura	-10.0 a 120.0 °C	0,01°C	$\pm 0,2$ °C

Tabla 3.2.2.4.1: Especificaciones PHT004TA

Fuente: Operating Instructions PHT004TA. Pag. 5.

Una vez concluidas las pruebas se registran en la base de datos Milkdata, en la que se detalla el nombre de proveedor, cantidad en litros recibidos y las medidas de los parámetros mencionados, para entonces ser aprobada o rechazada.

3.2.3 Filtración

La leche que ha sido aceptada, se procede a filtrar a través de lienzos con el fin de evitar el paso de impurezas.

3.2.4 Llegada a la marmita

La leche se traslada a la marmita a través de bombas succionadoras por medio del uso de mangueras.

3.2.5 Pasteurización

Una vez que la leche se encuentre dentro de la marmita, con el fin de estandarizar la calidad microbiológica de la leche y destruir posibles patógenos, ésta es sometida a un tratamiento térmico mínimo de 70°C durante 15 segundos. En seguida se procede a llevar la leche al intercambiador de placas para bajar la temperatura (36°C - 37°C).

3.2.6 Adición de cloruro de calcio

Luego la leche se lleva a la tina de cuajado en donde se agrega el cloruro de calcio previamente disuelto en agua pasteurizada y fría. La cantidad máxima que se debe usar es de 0,2 gr por cada litro de leche, es necesario agregarlo al menos quince minutos antes de agregar el cuajo.

3.2.7 Adición de Fermento Mesófilo

Se adiciona fermento mesófilo homofermentativo R-703 en una cantidad adecuada (0,0008%- 0,0012%), teniendo precaución de que la temperatura de inoculación se mantenga estable durante el tiempo de incubación (30 - 45min).

3.2.8 Cuajado

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se procede a inocular el cuajo previamente diluido en agua pasteurizada y fría. El mismo se debe disolver de 40 a 50 veces su volumen. Inmediatamente se debe agitar y remover durante unos 2-5 minutos.

3.2.9 Coagulación

La leche se mantiene en reposo y se procede a esperar la coagulación de la misma durante un lapso de 20 min, teniendo precaución que la temperatura (36°C - 37°C) se mantenga durante este tiempo.

3.2.10 Corte

Transcurrido el tiempo de coagulación, la cuajada es primero cortada horizontalmente y luego verticalmente, utilizando liras con separaciones en cubos de 1-1,5 cm². (National Dairy Council, 2004).

3.2.11 Primera agitación

Después del corte, los granos del queso son blandos y débiles por lo que la agitación debe ser suave y cuidadosa para no romper los granos y perder sustancias secas en el suero. La agitación se realiza aproximadamente por unos 2 min., utilizando la pala de acero inoxidable, y se deja reposar la masa por unos 3 minutos antes de empezar el primer desuerado.

3.2.12 Primer desuerado

Una vez transcurrido el tiempo de reposo, se procede la separación del suero que impregna el coágulo, utilizando recipientes de acero inoxidable, obteniéndose entonces la parte sólida que constituye la cuajada.

3.2.13 Segunda agitación

En seguida se realiza una segunda agitación con mayor intensidad que la primera. El tiempo de agitación es de 2 minutos aproximadamente, y se deja reposar la masa por unos 3 minutos antes de empezar el segundo desuerado.

3.2.14 Segundo desuerado

Este desuerado equivale a un 70 por ciento del suero total.

3.2.15 Moldeado

Inmediatamente se realiza la colocación de la cuajada en moldes rectangulares de acero inoxidable. Luego se realiza un volteo con la finalidad de facilitar la salida de suero y posteriormente se procede a revestir los quesos con lienzo y se los coloca dentro del molde.

3.2.16 Salado

El salado se lo realiza por frotación en una concentración no mayor al 4%.

3.2.17 Prensado

Se coloca los quesos en la prensa a una presión mínima por 20 min y trascurrido este tiempo se da una presión máxima por un lapso de 18 horas.

3.2.18 Almacenado y Empaquetado

Se almacenan a una temperatura de 4°C por 4 días y se empaquetan. Antes de que se vendan, los quesos hay que limpiarlos bien y envasarlos para que se presenten bien a los consumidores.

3.3 Diagrama de flujo

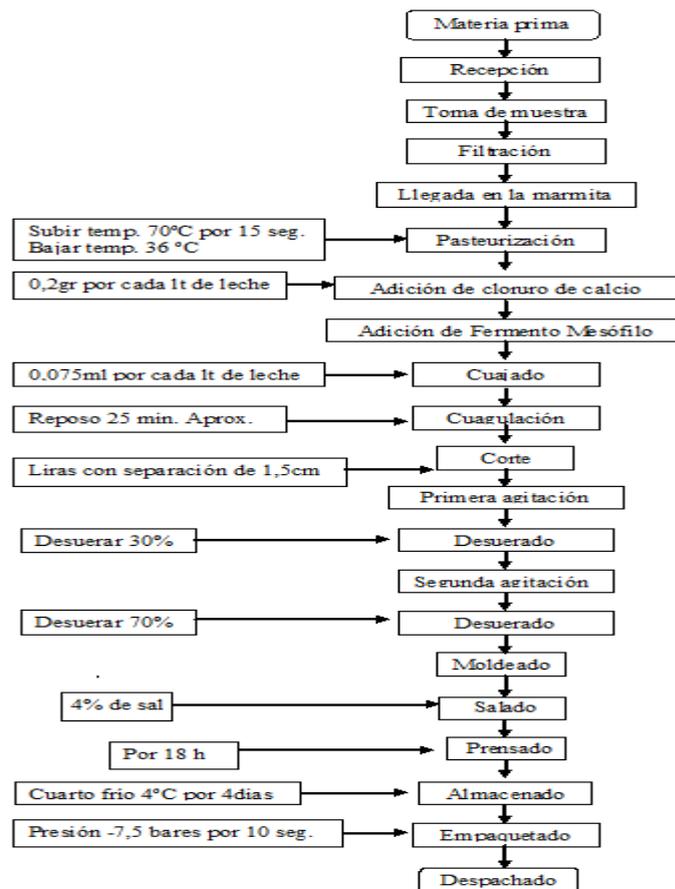


Figura 3.3.1 Diagrama de flujo queso fresco con fermento.

3.4 Política de inocuidad de la empresa Nandito

En productos lácteos Nandito están comprometidos con la elaboración y comercialización de productos de excelente calidad, que aporten a la nutrición y no comprometan la salud de los consumidores, satisfaciendo sus requisitos tales como sabor, frescura e inocuidad; por eso la higiene constituye uno de los principales elementos inherentes en todas las actividades de la elaboración.

Bajo el marco de ésta política, la empresa cuenta con un manual propio de Buenas Prácticas de Manufactura, en el cual se incluye procedimientos de operación estándar de sanitización, así como también requisitos necesarios para que las instalaciones, equipos, implementos y personal contribuyan a asegurar y garantizar la inocuidad del producto final. También en este manual se describe las medidas preventivas y correctivas para evitar la contaminación durante el proceso de elaboración de queso fresco Nandito, tomando en cuenta aspectos muy importantes como la materia prima, ingredientes, agua para el proceso, empaque, químicos para la limpieza y desinfección, empaque, y almacenamiento. Y por último se señala las condiciones y precauciones y métodos a seguir durante la distribución, trazabilidad, gestión de la documentación, condiciones del proceso, diagrama del proceso, flujo del producto, flujo del personal y puntos críticos de control. Todo esto con el fin de mejorar continuamente el desempeño de los procesos, personal, habilidades y experiencia; para fortalecer la posición en el mercado de éste producto y la rentabilidad de la empresa.

3.5 Conclusiones

Según lo expuesto en éste capítulo, la empresa Nandito cuenta con una política de inocuidad muy bien estructurada, y además dispone de un proceso tecnológico de producción apto para la aplicación de fermentos en el queso fresco, lo cual da la posibilidad de trabajar correctamente en la elaboración de los experimentos que se requieran realizar posteriormente en el diseño experimental.

CAPITULO IV

DISEÑO EXPERIMENTAL DE MEZCLAS

Introducción

En este cuarto capítulo se da una descripción de las etapas que deberán emplearse para resolver el problema en estudio. Así como también se da a conocer los procedimientos respectivos, fórmulas, conceptos, etc. de la metodología empleada para la realización del diseño experimental de mezclas; lo que servirá de guía para lograr el objetivo planteado.

4.1 Definición del diseño experimental

El diseño experimental es una técnica científica que utiliza una secuencia completa de los pasos que se deben tomar de antemano, para planear y asegurar la obtención de toda la información relevante y adecuada al problema bajo investigación, la cual será analizada estadísticamente para obtener conclusiones válidas y objetivas con respecto a los objetivos planteados.

Dicha información facilita el desarrollo de nuevos productos y procesos, ayuda a mejorar la comprensión de un sistema y facilita la toma de decisiones sobre cómo optimizarlo para mejorar su calidad.

4.2. Objetivos del diseño experimental

La aplicación de una metodología matemática y estadística que permite lograr una planificación y análisis de los experimentos, y brinda la oportunidad de obtener la máxima cantidad de información con el menor número de experimentos posible. Logrando una experimentación eficiente con el menor costo, menor tiempo y con una mayor calidad de los modelos.

El diseño experimental tiene además los siguientes objetivos:

- Comprender el sistema en estudio para determinar las variables que tienen mayor influencia en la respuesta, así como también los valores en los que se debe centrar el análisis experimental.
- Buscar la influencia de los factores sobre los resultados.
- Determinar el mejor valor de los factores que proporcionen respuestas de mayor calidad.
- Determinar la manera cómo afecta a la respuesta las variaciones no controladas del valor de los factores.

4.3 Ciclo de resolución de problemas

4.3.1 Análisis del problema

Esto incluye una clara definición del problema a resolver y los objetivos de la investigación. Es decir, qué es lo que el investigador planea hacer y porque.

4.3.2 Planificación de los experimentos

Con la planificación se pretende realizar solo experimentos que contengan información útil a la investigación. La experimentación se realiza en diversas etapas secuencialmente, en cada una de éstas las series de experimentos se agrupan en diseños llamados matrices de experimentos. Al plantear un experimento se debe escoger los factores que influyen en la respuesta considerando su significancia estadística.

4.3.3 Ejecución de los experimentos

En el diseño experimental las variables están codificadas. Estas se particularizan para los factores en estudio, y se realiza la experimentación en orden aleatorio respecto al orden al cual están listados. Se debe tener extremo cuidado y seguir un procedimiento estándar para asegurarse de que el plan experimental sea llevado

correctamente y que las observaciones sean apropiadamente registradas, de tal manera de evitar variaciones relevantes en la medida experimental.

4.3.4 Tratamiento estadístico de los datos

Dependiendo del modelo y del diseño, se deben realizar los procesos de cómputo necesario. Experimentos complejos o muy grandes requieren el uso de computadoras para llevar a cabo esto.

4.3.5 Análisis estadístico de los resultados

Se puede calcular los coeficientes de las variables a través del método de mínimos cuadrados.

4.3.6 Regreso al paso uno

Al obtener la información de una serie de experimentos se integra y planifica para los posteriores experimentos. Con el fin de concretar mejor los objetivos ya sea descartando factores que se han visto no eran importantes o modificando su dominio experimental.

4.4 Range scaling

El Range scaling o escalado de variables es la homogenización de las escalas de medidas de las variables, llevando a cada una a un rango máximo (+1) y mínimo (-1); ya que es muy frecuente utilizar variables con rangos de medidas distintas, lo que genera inconvenientes en la interpretación, porque las variables que contienen valores numéricos mayores no permiten visualizar información que generan variables con datos numéricamente bajos.

Para lograr el escalado de variables se sigue la siguiente fórmula:

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

Ecuación 4.4.1: Escalado de variables.

Fuente: PAVAN M. 2003. "Total and partial ranking methods in chemical sciences", Ph.D. Thesis in chemical sciences, University of Milano-Bicocca., Milano - Italy.

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

$X =$ *valor máximo de cada variable*

$X' = +1$

$X =$ *valor mínimo de cada variable*

$X' = -1$

4.5 Funciones de utilidad

La función de utilidad es un instrumento que nos da la posibilidad de unificar los resultados de los factores en estudio, en una única respuesta para obtener una información global. Cada criterio es transformado independientemente en una utilidad U_k por una función que transforma el valor actual de cada elemento en un valor entre 0 a 1, lo que nos permite tener una estrategia para la toma de decisiones.

$$U_{ki} = f_k(Y_{ki})$$

Ecuación 4.5.1: Función de utilidad.

Fuente: PAVAN M. 2003. "Total and partial ranking methods in chemical sciences", Ph.D. Thesis in chemical sciences, University of Milano-Bicocca., Milano - Italy.

$$0 \leq U_{ki} \leq 1$$

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/.

Para el caso de la función de utilidad global U , viene definida por la siguiente ecuación:

$$U = \sum_k w_k u_{ki}$$

$$0 \leq U \leq 1$$

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

Las funciones de utilidad empleadas son:

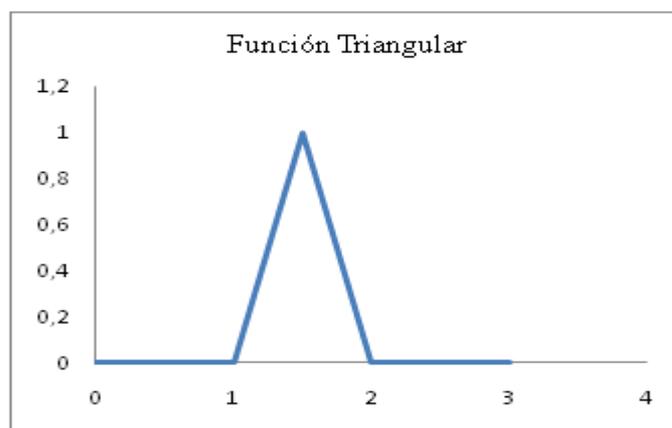


Figura 4.5.1: Función triangular.

Fuente: TODSCHINI R. 1998. "Introduzione alla Chemiometria", Edites S.R.L., Napoli - Italia.

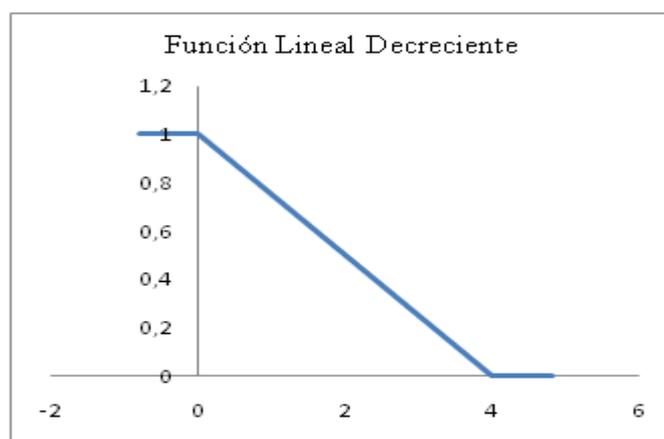


Figura 4.5.2: Función lineal decreciente.

Fuente: TODSCHINI R. 1998. "Introduzione alla Chemiometria", Edites S.R.L., Napoli - Italia.

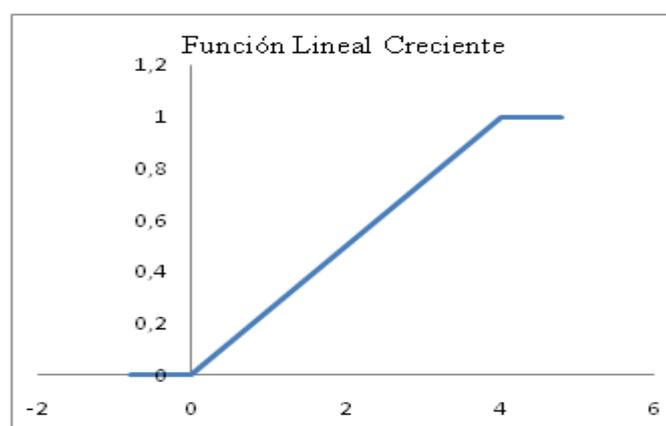


Figura 4.5.3: Función lineal creciente.

Fuente: TODSCHINI R. 1998. "Introduzione alla Chemiometria", Edites S.R.L., Napoli - Italia.

En donde:

Escala de los valores de la función de utilidad (FU)	
Valor de FU	Valorización de la utilidad
1,00-0,80	Excelente
0,8-0,63	Bueno
0,63-0,37	Aceptable medianamente
0,37-0,20	Límite de aceptabilidad
0,20-0,00	No aceptable

Tabla 4.5.1: Escala de los valores de la FU.

Fuente: TODSCHINI R. 1998. "Introduzione alla Chemiometria", Edites S.R.L., Napoli - Italia.

4.6 Diseño experimental factorial completo a dos niveles para tres variables

El diseño experimental factorial completo es aquel en el cual se realizan todos los combinaciones posibles de niveles de las variables, para lograr un conocimiento sobre una respuesta y revelar si hay interacción entre estas variables.

Generalmente, en un diseño experimental, las variables en estudio se colocan a dos niveles que se los conoce como niveles altos (+1) y niveles bajos (-1).

Para la resolución de un diseño factorial a dos niveles para tres variables se debe seguir los siguientes pasos:

- a) Elegir el número de variables (k) que se estudiarán en el diseño, considerando que el factor presente influencia en la respuesta.
- b) Construir la matriz del diseño, en la cual el número de experimentos viene definido por 2^k .
- c) Realización de cada uno de los experimentos propuestos en la matriz de diseño.
- d) Análisis e interpretación estadística.

NÚMERO DE EXPERIMENTOS PARA UN DISEÑO FACTORIAL 2^k	
Número de factores	Número de experimentos
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
7	128

Tabla 4.6.1: Número de experimentos para un diseño factorial 2^k .

Fuente: TODESCHINI R. 1998. "Introduzione alla Chemiometria", Edites S.R.L., Napoli - Italia.

4.6.1 Matriz del diseño experimental a dos niveles y tres variables

Debido a que el número de factores (k) es igual a tres, el número de experimentos a realizarse serán ocho. Para esto la matriz de diseño experimental será la siguiente:

MATRIZ DEL DISEÑO EXPERIMENTAL 2^3					
Exp.	I	X_1	X_2	X_3	FU
1	+1	-1	-1	-1	FU ₁
2	+1	+1	-1	-1	FU ₂
3	+1	-1	+1	-1	FU ₃
4	+1	+1	+1	-1	FU ₄
5	+1	-1	-1	+1	FU ₅
6	+1	+1	-1	+1	FU ₆
7	+1	-1	+1	+1	FU ₇
8	+1	+1	+1	+1	FU ₈

Tabla 4.6.1.1: Matriz del diseño experimental.

Fuente: TODESCHINI R. 1998. "Introduzione alla Chemiometria", Edites S.R.L., Napoli - Italia.

Por lo tanto para efectuar la matriz del modelo experimental se debe realizar todas las combinaciones posibles entre las variables. Así tenemos:

MATRIZ DEL MODELO EXPERIMENTAL 2 ³									
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	FU
1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	FU ₁
2	+1	+1	-1	-1	-1	-1	+1	+1	FU ₂
3	+1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	FU ₃
4	+1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	FU ₄
5	+1	-1	-1	+1	+1	-1	-1	+1	FU ₅
6	+1	+1	-1	+1	-1	+1	-1	-1	FU ₆
7	+1	-1	+1	+1	-1	-1	+1	-1	FU ₇
8	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	FU ₈

Tabla 4.6.1.2: Matriz del modelo experimental.

Fuente: TODESCHINI R. 1998. "Introduzione alla Chemiometria", Edites S.R.L., Napoli - Italia.

4.7 Obtención de los coeficientes de cada variable e interacciones.

Estos coeficientes se obtienen mediante regresión de mínimos cuadrados multivalente, aplicando la fórmula:

$$Y = X * b + e$$

Ecuación 4.7.1: Obtención de coeficientes de cada variable.

$$\begin{bmatrix} Y_1 \\ Y_2 \\ Y_3 \\ Y_4 \\ Y_5 \\ Y_6 \\ Y_7 \\ Y_8 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} +1 & -1 & -1 & -1 & +1 & +1 & +1 & -1 \\ +1 & +1 & -1 & -1 & -1 & -1 & +1 & +1 \\ +1 & -1 & +1 & -1 & -1 & +1 & -1 & +1 \\ +1 & +1 & +1 & -1 & +1 & -1 & -1 & -1 \\ +1 & -1 & -1 & +1 & +1 & -1 & -1 & +1 \\ +1 & +1 & -1 & +1 & -1 & +1 & -1 & -1 \\ +1 & -1 & +1 & +1 & -1 & -1 & +1 & -1 \\ +1 & +1 & +1 & +1 & +1 & +1 & +1 & +1 \end{bmatrix} * \begin{bmatrix} b_0 \\ b_1 \\ b_2 \\ b_3 \\ b_4 \\ b_5 \\ b_6 \\ b_7 \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e_1 \\ e_2 \\ e_3 \\ e_4 \\ e_5 \\ e_6 \\ e_7 \\ e_8 \end{bmatrix}$$

Y = vector respuesta

X = matriz del modelo experimental

b = coeficientes de las variables

Donde b se obtiene de la siguiente manera:

$$\begin{aligned}
 Y &= b * X \\
 Y * X^T &= b * (X * X^T) \\
 Y * X^T * (X * X^T)^{-1} &= b * (X * X^T) * (X * X^T)^{-1} \\
 b &= (X * X^T)^{-1} * X^T * Y
 \end{aligned}$$

Ecuación 4.7.2: Vector respuesta.

Fuente: PAVAN M. 2003. “Total and partial ranking methods in chemical sciences”, Ph.D. Thesis in chemical sciences, University of Milano-Bicocca., Milano - Italy.

4.7.1 Aplicación de Half Normal Plot

El Half Normal Plot es un método gráfico que nos ayuda a detectar las variables más relevantes para el modelo. Aquí los coeficientes más significativos se encuentran ubicados fuera de la recta y los no significativos se encuentran sobre la recta.

4.7.1.1 Pasos a seguirse para el desarrollo del método

- a) Se calcula los coeficientes de las variables e interacciones.
- b) Se ordenan los coeficientes en orden ascendente.
- c) Se calcula la probabilidad de cada factor así: $(1-1/2)/\text{Número de factores}$, $(2-1/2)/\text{Número de factores}$, etc.
- d) Se divide en un intervalo de 1-100 (probabilidad en el eje de las ordenadas) y de 0-1 (coeficientes en el eje de las abscisas).
- e) Grafico los puntos y trazo una recta entre los puntos con mayor pendiente.
- f) Identifico los coeficientes más distantes a la recta y por ende los factores o variables relevantes en el modelo.

4.8 Aplicación del método de la máxima pendiente para la optimización

Este método se basa en la pendiente de la superficie de respuesta, tomando un modelo lineal. Se obtiene evaluando los incrementos asignados a cualquier variable de tal forma de maximizar la respuesta.

$$Y = b_0 + \sum_{j=1}^k b_j * X_j$$

$$Y + \Delta Y = b_0 + \sum_{j=1}^k b_j * (X_j + \Delta X_j)$$

Para lograr el máximo incremento ΔY , cada variable X_j debe ser modificada por un incremento ΔX_j proporcional al coeficiente b_j , por lo tanto:

$$\Delta X = b * k$$

Ecuación 4.8.1: Método de la máxima pendiente para la optimización.

$$\begin{bmatrix} X_1 \\ X_2 \\ \dots \\ X_k \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} X_1 \\ X_2 \\ \dots \\ X_k \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} \Delta X_1 \\ \Delta X_2 \\ \dots \\ \Delta X_k \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} X_1 \\ X_2 \\ \dots \\ X_k \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} b_1 \\ b_2 \\ \dots \\ b_k \end{bmatrix} * k$$

4.9 Conclusiones

En este capítulo se ha visto que se debe planificar previamente los experimentos a través de un ciclo de resolución de problemas adecuado para el problema que se desea resolver; para lograr una experimentación eficiente que permita obtener la máxima cantidad de información con el menor número de experimentos posibles y con mayor calidad de los modelos. Finalmente se ha visto la metodología a seguir para la optimización por el método de la máxima pendiente.

CAPITULO V

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Introducción

En éste capítulo se presenta el problema a resolver, el cual es el de optimizar las características organolépticas en cuanto a sabor, olor, y textura del queso fresco elaborado en la industria Nandito mediante la aplicación de fermentos lácticos, por lo que se ha planteado el estudio de tres variables que influyen directa e independientemente en el desarrollo del mismo, y estas son: Temperatura de inoculación del fermento, tiempo de recorrido del fermento y porcentaje de inoculación del fermento.

A través de una etapa exploratoria “Screening” de las variables, se plantea su influencia y relevancia en función de la calidad gustativa del queso fresco. En donde se emplea un matriz de diseño experimental 2^3 , donde los experimentos a realizarse son ocho más cuatro réplicas. Los experimentos se realizaron siguiendo un procedimiento estandarizado que se lleva a cabo en la misma industria Nandito, para posteriormente ser codificados y realizarse las cataciones respectivas con la ayuda de 27 panelistas elegidos. Una vez obtenidos los resultados se procedió a su tratamiento estadístico, y mediante la aplicación de funciones multicriterio de utilidad se logró englobar las distintas sensaciones gustativas en una respuesta unificada. Luego se utilizó el método de mínimos cuadrados con el cual se obtuvo el coeficiente de cada una de las variables y sus interacciones, para posteriormente aplicar el método de Half Normal Plot que permitió determinar las variables más relevantes del modelo. Finalmente se utilizó el método de la máxima pendiente que sirvió para determinar el punto óptimo en el que convergen las variables, es decir, donde se genera mayor respuesta.

5.1 Selección de las variables directas y sus valores

Para la resolución del problema planteado se analizó qué variables independientes influyen en el desarrollo de los fermentos en el queso fresco. Logrando obtener las siguientes: Temperatura de inoculación del fermento, tiempo de recorrido del fermento y porcentaje de inoculación del fermento.

RANGO DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES NATURALES DE LAS VARIABLES				
Variable	Unidad	Valor mínimo	Punto Central	Valor máximo
Porcentaje del inóculo	%	0,0008	0,001	0,0012
Temperatura	°C	36	36,5	37
Tiempo recorrido	min	30	37,5	45

Tabla 5.1.1: Rango de las condiciones experimentales naturales de las variables.

5.2 Screening de las variables

Se procedió a obtener las unidades escalares despejando X de ecuación 4.4.1:

$$X = \frac{(X' + 1) * (X_{max} - X_{min})}{2} + X_{min}$$

Entonces tenemos:

RANGO DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES ESCALADAS				
Variable	ID	Valor mínimo	Punto central	Valor máximo
Porcentaje del inóculo	X1	(-1)	0	(+1)
Temperatura	X2	(-1)	0	(+1)
Tiempo recorrido	X3	(-1)	0	(+1)

Tabla 5.2.1: Rango de las condiciones experimentales escaladas.

5.3 Matriz de diseño experimental 2³

Experimento	X1	X2	X3
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
R1	0,5	0,5	0,5
R2	0,5	0,5	0,5
R3	0,5	0,5	0,5
R4	0,5	0,5	0,5

Experimento	Inóculo (%)	Temperatura(°C)	Tiempo recorrido(min)
	X1	X2	X3
1	0,0008	36	30
2	0,0012	36	30
3	0,0008	37	30
4	0,0012	37	30
5	0,0008	36	45
6	0,0012	36	45
7	0,0008	37	45
8	0,0012	37	45
R1	0,001	36,5	37,5
R2	0,001	36,5	37,5
R3	0,001	36,5	37,5
R4	0,001	36,5	37,5

Tabla 5.3.1: Matriz del diseño experimental 2³.

5.4 Análisis de atributos sensoriales

Para determinar la eficiencia de los fermentos usados y sus mezclas como mejoradores de características organolépticas, se realizó un análisis sensorial descriptivo de textura, sabor y olor. Para una correcta realización de análisis sensorial se necesitó de medios y materiales adecuados como:

- La sala de degustación.- La misma que estuvo ubicada en un laboratorio de la Universidad del Azuay en la facultad de Ciencia y Tecnología, se verifico previamente que el lugar fuese tranquilo y confortable para evitar la distracción del catador. Cada catador contó con agua potable sin olor ni sabor a temperatura constante para los enjuagues de la boca entre muestra y muestra. El área para la preparación de muestras se lo realizó en el laboratorio de lácteos ubicado en la misma facultad.
- Tiempo de realización.- Las pruebas de catación se realizaron entre las 5pm y 6pm. Antes de las comidas debido a que la sensibilidad es mayor.
- Número de muestras por sesión.- El número de muestras en cada sesión fue de 2 muestras dejando un tiempo de descanso de aproximadamente 5 min durante el cual los catadores eliminaron residuos de la prueba anterior, enjuagando la boca con agua a temperatura ambiente y buena salivación.
- Preparación de la muestra.- Se cortó en cubos de 2 x 2 cm y se dio a cada catador de 25gr a 30gr del producto.
- Codificación y orden de presentación.- No se proporcionó al catador ninguna información sobre la identidad de las muestras o del tratamiento que hayan sufrido. Se usaron codificaciones de letras y números al azar. No se incluyeron el numero 1 o letra A en la codificación ya que predisponen al catador. No se usaron las mismas claves en días sucesivos ya que sugieren al catador los juicios emitidos con anterioridad.
- El panel de cata.- El panel estuvo constituido un panel de 27 catadores no especializados.

La ficha de cata empleada fue la siguiente:

Ficha Técnica de Cata para una prueba descriptiva

Código:	Nombre del catador:
Producto: Queso Fresco	

A.- Objeto del ensayo: Determinación de la textura del producto

1.- Atributos de textura

Instrucción:	<i>Mastique el producto y mantenga en la boca por un tiempo; evalúe con un visto, la característica que mejor represente su criterio.</i>		
Textura seca	Textura mojada	Textura húmeda	Textura acuosa

Instrucción:	<i>Mastique y reduzca y trague el producto, señale con un visto, las características de acuerdo con su criterio.</i>			
	Nulo(0)	Débil(1)	Media(2)	Elevada(3)
Compacto				
Gomoso				

B.- Objeto del ensayo: Determinación del flavor del queso fresco

1.- Aroma

Instrucción:	<i>a) Clasifique según su aroma y luego escriba el grado de intensidad (nulo, débil, media o elevada), en el siguiente cuadro.</i>			
Intensidad	Leche cruda	Leche cocida	Ácido	Amoniacal
Nulo(0)				
Débil(1)				
Media(2)				
Elevada(3)				

2.- Sabor

Instrucción	<i>Mastique la muestra y señale, con un visto, la intensidad de las características del producto de acuerdo con su criterio. Basándose en que 0=nulo 1=débil 2=media 3=elevada 4=muy elevada</i>				
Intensidad	Salado	Amargo	Ácido	Amoniacal	Agradable
Nulo(0)					
Débil(1)					
Media(2)					
Elevada(3)					
Muy elevada(4)					

Tabla 5.4.1: Ficha técnica para una prueba descriptiva.

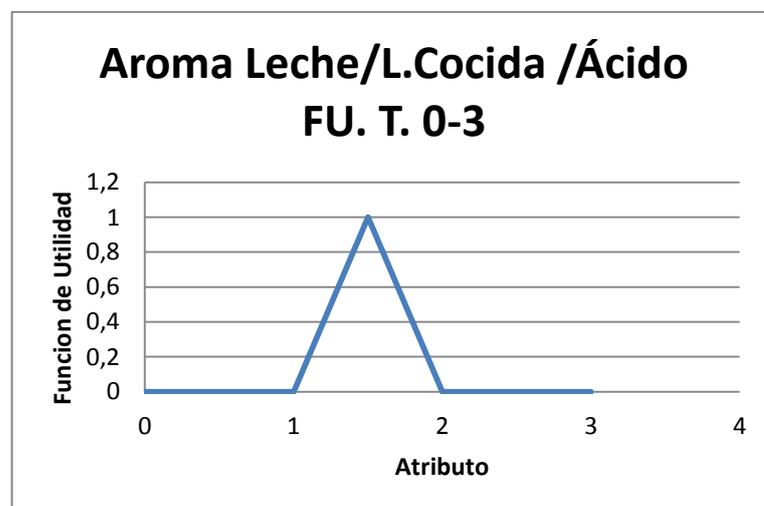
5.5 Funciones multicriterio de utilidad

Una vez obtenidos los resultados por medio de la ayuda del panel 27 catadores, se procedió a su tratamiento estadístico, y mediante la aplicación de funciones multicriterio de utilidad se logró englobar las distintas sensaciones gustativas en una respuesta unificada.

Funciones empleadas para valorar los atributos seleccionados		
	Atributo	Función de utilidad
a	Aroma	0-3
a.1	Leche Cruda	FU.Triangular
a.2	Leche Cocida	FU.Triangular
a.3	Acido	FU.Triangular
a.4	Amoniactal	FU.Lineal decreciente
b	Sabor	0-4
b.1	Salado	FU.Triangular
b.2	Amargo	FU Lineal decreciente
b.3	Acido	FU.Triangular
b.4	Amoniactal	FU.Lineal decreciente
b.5	Agradable	FU.Lineal creciente
c	Textura	0-3
c.1	Humedad Interna	FU.Triangular
c.2	Compacto	FU.Triangular
c.3	Gomoso	FU.Triangular

Tabla 5.5.1: Funciones de utilidad para valorar atributos seleccionados.

- Funciones de utilidad utilizadas para valorar el aroma.



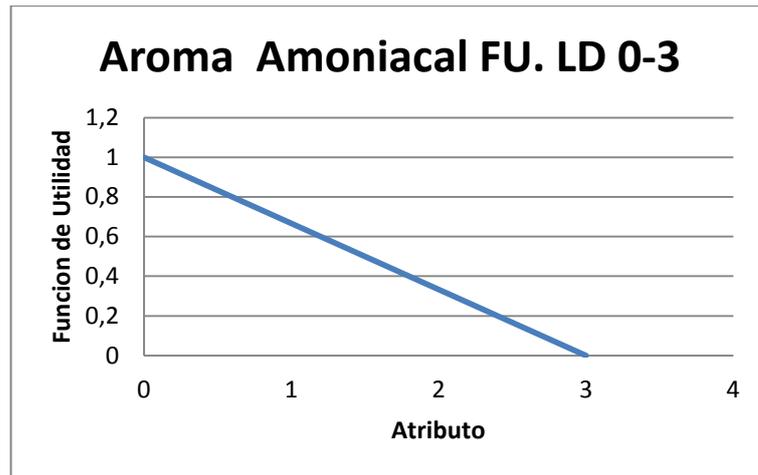
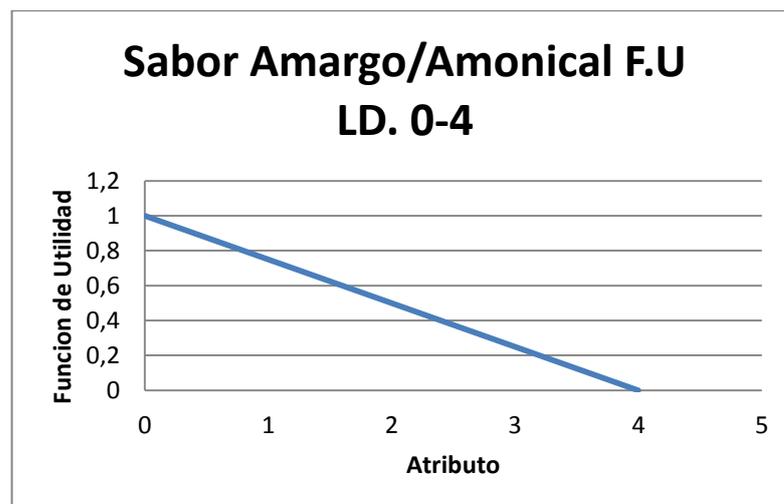
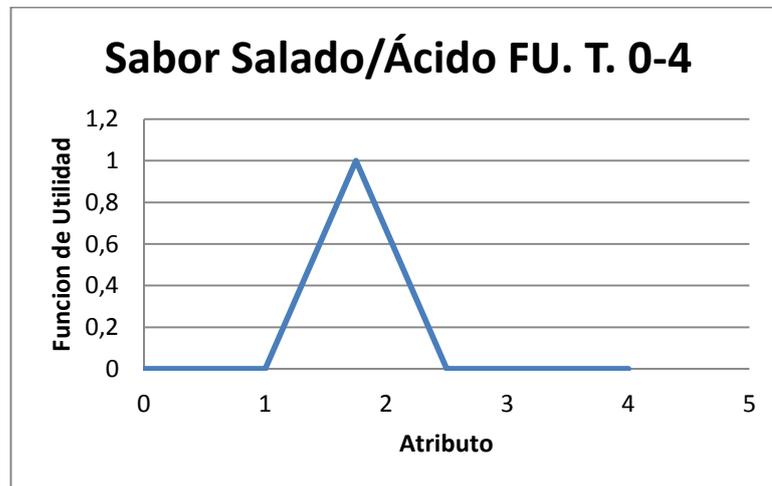


Figura 5.5.1. Funciones de utilidad para valorar el aroma.

- Funciones de utilidad utilizadas para valorar el sabor.



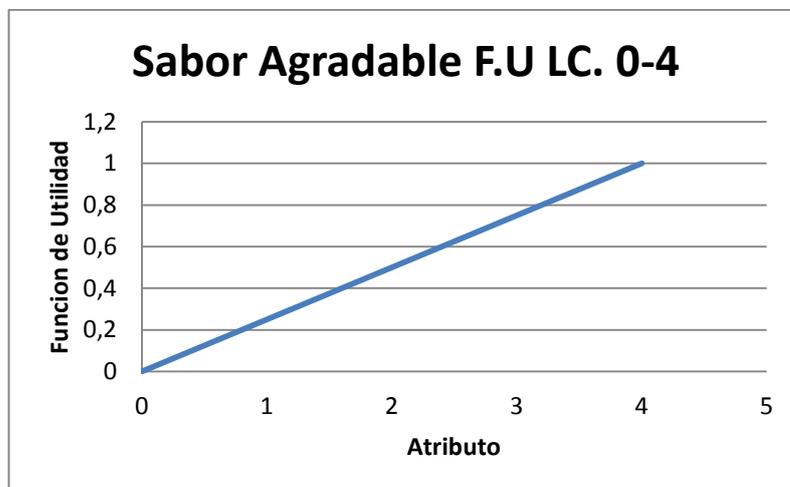


Figura 5.5.2: Funciones de utilidad para valorar el sabor.

- Funciones de utilidad utilizadas para valorar la textura.

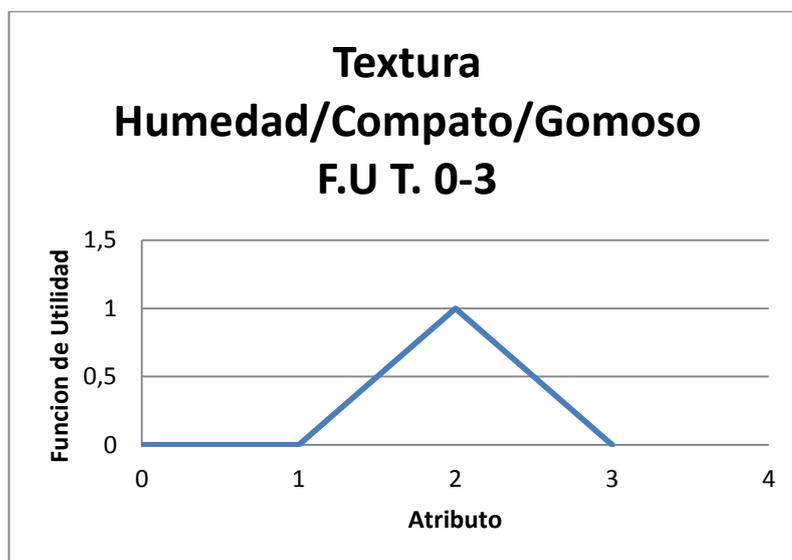


Figura 5.5.3: Funciones de utilidad para valorar la textura.

MEDIANA DE LOS ATRIBUTOS DE LOS PRIMEROS ENSAYOS Y CÁLCULO DE LA FUNCIÓN UTILIDAD GLOBAL													
EXPERIMENTO	AROMA				SABOR					TEXTURA			FU
	Leche Cruda	Leche Cocida	Acido	Amoniacal	Salado	Amargo	Acido	Amoniacal	Agradable	Humedad Interna	Compacto	Gomoso	
P1 ⁽¹⁾	0	0	0	1	0,66	0,75	0,66	1	0,75	1	1	1	0,6517
P2 ⁽²⁾	0	0	0	1	0,66	0,75	0,66	1	0,75	1	1	1	0,6517
P3 ⁽³⁾	0	0	0	1	0,66	0,75	0	1	0,75	1	1	0	0,5133
P4 ⁽⁴⁾	0	0	0	1	0,66	0,75	0	1	0,75	0	1	0	0,4300
P5 ⁽⁵⁾	0	0	0	1	0	0,75	0	1	0,5	0	1	0	0,3542
P6 ⁽⁶⁾	0	0	0	1	0	0,75	0	1	0,5	1	0	0	0,3542
P7 ⁽⁷⁾	0	0	0	1	0,66	0,75	0	1	0,5	1	0	0	0,4092
P8 ⁽⁸⁾	0	0	0	1	0	0,75	0	1	0,5	0	1	0	0,3542
P9 ⁽⁹⁾	0	0	0	1	0	0,75	0	1	0,5	1	0	0	0,3542
P10 ⁽¹⁰⁾	0	0	0	1	0	0,75	0	1	0,5	0	1	0	0,3542
P11 ⁽¹¹⁾	0	0	0	1	0	0,75	0	1	0,5	1	0	0	0,3542
P12 ⁽¹²⁾	0	0	0	1	0,66	1	0	1	0,75	0	1	0	0,4508

Tabla 5.5.2: Mediana de los atributos de los primeros ensayos y cálculo de la FU.

(1) Experimento 1: pag 83

(7) Experimento 7: pag 89

(2) Experimento 2: pag 84

(8) Experimento 8: pag 90

(3) Experimento 3: pag 85

(9) Réplica 1: pag 91

(4) Experimento 4: pag 86

(10) Réplica 2: pag 92

(5) Experimento 5: pag 87

(11) Réplica 3: pag 93

(6) Experimento 6: pag 88

(12) Réplica 4: pag 94

5.6 Método de mínimos cuadrados

Luego se utilizó el método de mínimos cuadrados (Tabla 4.6.1.2: Matriz del modelo experimental) con el cual se obtuvo el coeficiente de cada una de las variables y sus interacciones, de la siguiente manera:

MATRIZ DEL MODELO EXPERIMENTAL 2 ³									
Experimento	I	X1	X2	X3	X1X2	X1X3	X2X3	X1X2X3	FU
1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	0,6517 ⁽¹⁾
2	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	0,6517 ⁽²⁾
3	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	0,5133 ⁽³⁾
4	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	0,4300 ⁽⁴⁾
5	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	0,3542 ⁽⁵⁾
6	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	0,3542 ⁽⁶⁾
7	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	0,4092 ⁽⁷⁾
8	1	1	1	1	1	1	1	1	0,3542 ⁽⁸⁾
R1	1	0	0	0	0	0	0	0	0,3542 ⁽⁹⁾
R2	1	0	0	0	0	0	0	0	0,3542 ⁽¹⁰⁾
R3	1	0	0	0	0	0	0	0	0,3542 ⁽¹¹⁾
R4	1	0	0	0	0	0	0	0	0,4508 ⁽¹²⁾

Tabla 5.6.1: Matriz del modelo experimental 2³.

(1) Experimento 1: pag 83

(7) Experimento 7: pag 89

(2) Experimento 2: pag 84

(8) Experimento 8: pag 90

(3) Experimento 3: pag 85

(9) Réplica 1: pag 91

(4) Experimento 4: pag 86

(10) Réplica 2: pag 92

(5) Experimento 5: pag 87

(11) Réplica 3: pag 93

(6) Experimento 6: pag 88

(12) Réplica 4: pag 94

Se arma la matriz del modelo (Ecuación 4.7.1):

$$\begin{bmatrix} +1 & -1 & -1 & -1 & +1 & +1 & +1 & -1 \\ +1 & +1 & -1 & -1 & -1 & -1 & +1 & +1 \\ +1 & -1 & +1 & -1 & -1 & +1 & -1 & +1 \\ +1 & +1 & +1 & -1 & +1 & -1 & -1 & -1 \\ +1 & -1 & -1 & +1 & +1 & -1 & -1 & +1 \\ +1 & +1 & -1 & +1 & -1 & +1 & -1 & -1 \\ +1 & -1 & +1 & +1 & -1 & -1 & +1 & -1 \\ +1 & +1 & +1 & +1 & +1 & +1 & +1 & +1 \end{bmatrix} * \begin{bmatrix} b_0 \\ b_1 \\ b_2 \\ b_3 \\ b_{12} \\ b_{13} \\ b_{23} \\ b_{123} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0,6517 \\ 0,6517 \\ 0,5133 \\ 0,4300 \\ 0,3542 \\ 0,3542 \\ 0,4092 \\ 0,3542 \end{bmatrix}$$

	b₀	b₁	b₂	b₃	b₁₂	b₁₃	b₂₃	b₁₂₃
Coeficiente	0,46479	-0,01729	-0,03813	-0,09688	-0,01729	0,00354	0,05188	0,00354

5.7 Half Normal Plot

A continuación se aplicó el método de Half Normal Plot que permitió determinar las variables más relevantes del modelo.

Por lo que se determinó que las variables X_2 , X_3 y la interacción X_2X_3 son las más distantes a la recta por lo que son las más significantes.

Se obtuvo el siguiente polinomio lineal de screening:

$$F.U = 0,464790 - 0,03813X_2 - 0,09688X_3 + 0,05188X_2X_3$$

Ecuación 5.7.1: Polinomio lineal de screening.

Se puede observar que la variable X_1 fue eliminada debido a que no es relevante en el modelo de estudio.

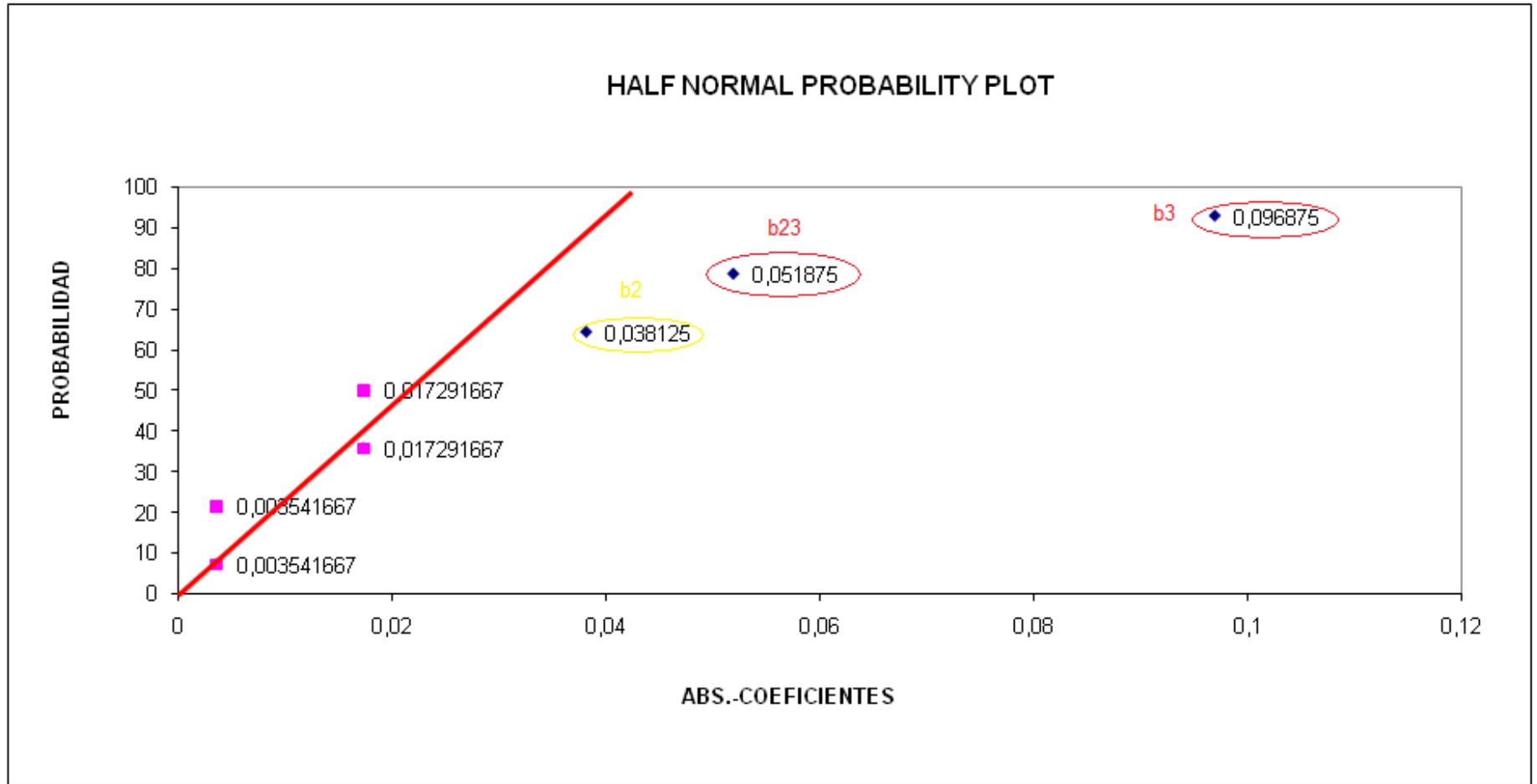


Tabla 5.7.1: Half Normal probability plot.

5.8 Método de la máxima pendiente

Para la optimización sobre la calidad gustativa del queso fresco con fermentos, utilizó el método de la máxima pendiente, en la cual se seleccionó la matriz de diseño del mejor experimento, es decir la matriz que representa la función de utilidad más alta. Por lo que se procedió a aplicar la ecuación 4.8.1, con el fin de determinar los nuevos valores experimentales con los cuales se debe ejecutar el nuevo experimento:

$$\Delta X = b * k$$

$$\begin{bmatrix} X_1 \\ X_2 \\ \dots \\ X_k \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} X_1 \\ X_2 \\ \dots \\ X_k \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} \Delta X_1 \\ \Delta X_2 \\ \dots \\ \Delta X_k \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} X_1 \\ X_2 \\ \dots \\ X_k \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} b_1 \\ b_2 \\ \dots \\ b_k \end{bmatrix} * k$$

$$[X_k] = [X_k] + [b_k] * k$$

Entonces tenemos:

$$\begin{bmatrix} -1,07626 \\ -1,19376 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -1 \\ -1 \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} -0,03813 \\ -0,09688 \end{bmatrix} * \begin{bmatrix} 2 \\ 2 \end{bmatrix}$$

$$\frac{1}{0,5} = \frac{-1,07626}{X'_2}$$

$$X'_2 = -0,53813$$

$$X'_2 = 36,5 - 0,53813 = 35,96 = 36$$

$$\frac{1}{7,5} = \frac{-1,19376}{X'_3}$$

$$X'_3 = -8,9532$$

$$X'_3 = 37,5 - 8,9532 = 28,54 = 29$$

VALOR DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES DE LAS VARIABLES OBTENIDAS POR OPTIMIZACIÓN			
Variable	ID	Unidad	Valor
Temperatura	X2	°C	36
Tiempo recorrido	X3	min	29

Tabla 5.8.1: Valor de las condiciones experimentales de las variables obtenidas por optimización.

5.9 Resultado de la aplicación de los valores de las variables obtenidas por optimización y selección de las condiciones de la máxima respuesta

Se procedió a la elaboración del experimento por duplicado, mediante la aplicación de los valores de las variables obtenidos por optimización; los cuales se indican en la tabla 5.8.1; dando como resultado en la tabulación, el valor de la función de utilidad de 0,6725; que comparándola con las funciones de utilidad de los experimentos 1 y 2 (FU= 0,6517), se establece que la respuesta experimental optimizada es mayor; por lo tanto, éste es el punto óptimo donde mejor interactúan las variables.

VALORES ÓPTIMOS DONDE MEJOR INTERACTUAN LAS VARIABLES.			
Variable	ID	Unidad	Valor
Porcentaje del inóculo	X1	%	0,001
Temperatura	X2	°C	36
Tiempo recorrido	X3	min	29

Tabla 5.9.1: Valores óptimos donde mejor interactúan las variables.

5.10 Conclusiones

Por lo que podemos apreciar el método de la máxima pendiente es el que mejor se aplica a este trabajo experimental ya que nos da a conocer los valores en los que las variables representan la máxima respuesta sensorial. Además, es importante acotar que se aplicó el método el diseño central compuesto, el mismo que no pudo ser

aplicable debido a que el polinomio obtenido estuvo fuera del campo de respuesta, es decir el polinomio no es aplicable porque no resulta significativo (figura 5.10.1).

Tomando en cuenta el polinomio obtenido mediante el método de optimización de la máxima pendiente; se puede apreciar que la variable X_3 = tiempo de recorrido, actúa significativamente, de tal manera que mientras ésta disminuye ligeramente su valor, la respuesta se ve favorecida. Es decir, que a medida que se produce mayor cantidad de ácido láctico la respuesta sensorial disminuye.

Con respecto a la interacción X_2X_3 = temperatura, tiempo de recorrido; se puede ver que la temperatura óptima para que el fermento se desarrolle de mejor manera es la de 36°C por 29 min, lo que quiere decir que existe una relación directa entre la temperatura de desarrollo del fermento y su tiempo de recorrido para alcanzar las características organolépticas más aceptadas, ya que existe una cantidad óptima de ácido láctico que se produce bajo estas condiciones específicas, el cual produce características organolépticas deseadas en el producto.

CAPITULO VI

DETERMINACIÓN DE BIOMASA Y ANÁLISIS DEL TIEMPO DE VIDA ÚTIL

Introducción

Aplicando los valores óptimos donde mejor interactúan las variables, se realizó la elaboración de queso fresco con fermento, con el objeto de determinar la cantidad de biomasa y ácido láctico que tendrá un efecto de conservación y modificación de características organolépticas del producto.

Una vez obtenido el valor generado de biomasa y ácido láctico, se realiza el análisis del tiempo de vida útil del queso obtenido por optimización, mediante la aplicación de la ecuación de Arrhenius, con el fin de determinar el tiempo que éste puede expendirse en el mercado a una cierta temperatura, conservando sus características de calidad tanto sensoriales como microbiológicas.

6.1 Definición biomasa

A través de la acción microbiana sobre el medio de sustrato (lactosa), se obtiene como resultado biomasa y metabolitos. El microorganismo va aumentando en su concentración en el transcurso del proceso al mismo tiempo que el medio se va modificando y se forman productos nuevos como consecuencia de las actividades catabólicas y anabólicas. Se considera por biomasa a todo el conjunto de elementos vivos que componen un espacio geográfico y que actúan en combinación de muchas maneras diversas afectándolo tanto positiva como negativamente.

6.1.1 Cálculos de biomasa

DATOS	
Volumen(cc)	4000
Densidad(gr/cc)	1,029
Acidez(D)	16
Concentración inicial del inóculo	0,001
Temperatura de inoculación fermento (C)	36

T(h)	pH	°D	Gr de Acido láctico por cada 1000cm ³	% en masa de Acido láctico	Proceso
0	6,48	18,4	1,84	0,18	-----
0,05	6,47	18,5	1,85	0,18	-----
0,1	6,47	18,5	1,85	0,18	-----
0,15	6,47	18,5	1,85	0,18	-----
0,2	6,46	18,6	1,86	0,18	-----
0,25	6,46	18,6	1,86	0,18	-----
0,3	6,45	18,7	1,87	0,18	-----
0,344	6,44	18,8	1,88	0,18	-----
0,369	6,44	18,8	1,88	0,18	-----
0,392	6,42	19	1,9	0,18	-----
0,414	6,41	19,1	1,91	0,19	-----
0,429	6,41	19,1	1,91	0,19	-----
0,461	6,4	19,2	1,92	0,19	-----
0,483	6,39	19,4	1,94	0,19	Cuajado
0,561	6,38	19,5	1,95	0,19	-----
0,606	6,37	19,6	1,96	0,19	-----
0,658	6,32	20,1	2,01	0,20	-----
0,744	6,31	20,2	2,02	0,20	-----
0,782	6,31	20,2	2,02	0,20	-----
0,818	6,3	20,4	2,04	0,20	Corte
0,836	6,3	20,4	2,04	0,20	-----
0,854	6,29	20,5	2,05	0,20	-----
0,989	6,25	20,9	2,09	0,20	Moldeado
1	6,24	21	2,1	0,20	-----

Tabla 6.1.1.1: Valores de acides vs tiempo.

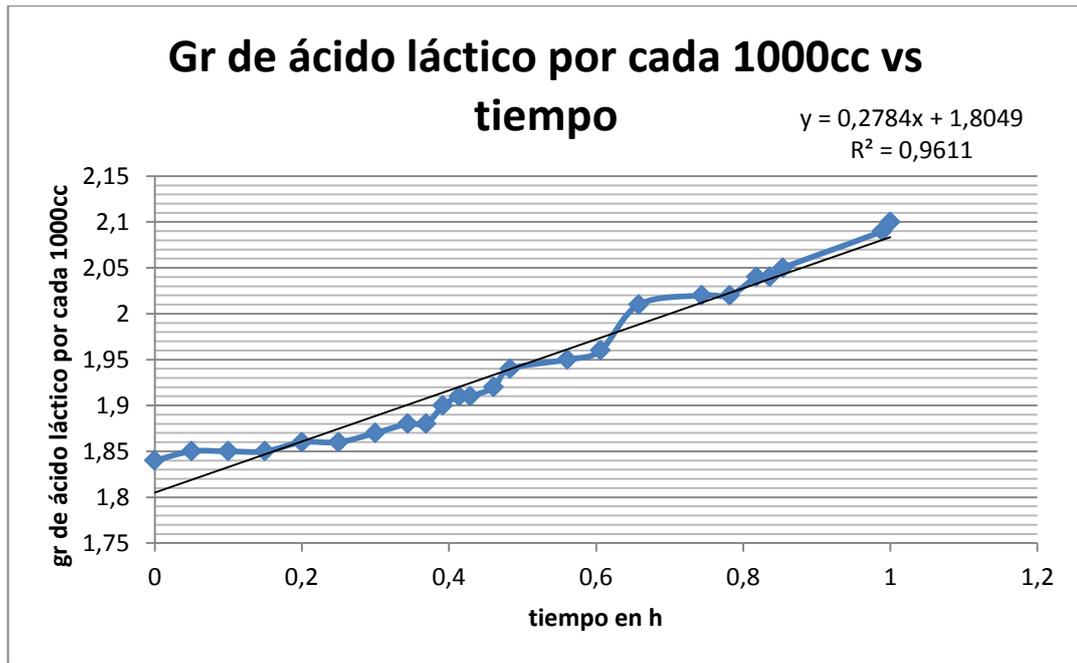


Figura 6.1.1.1: Gr de ácido láctico por cada 1000cc vs tiempo.

Ecuación de la recta (grAL vs T)	$y = 0,2784x + 1,8049$
Gr de ácido láctico por cada 1000cc producidos en 1h	1,94 (1)
Gr de ácido láctico en 4000cc producidos en 1h	7,78 (2)

Tabla 6.1.1.2: Determinación de gr de ácido láctico producidos en el proceso.

(1) Integración de la ecuación recta (gr AL vs T) desde 0h hasta 1h.

(2) Determinación de ácido láctico producido en 4lt (1,94*4).

Datos microbiológicos:

Tiempo (h)	UFC
0	1,60E+20 (1)
0,25	2,80E+20 (2)
0,5	4,30E+20 (3)
0,75	6,50E+20 (4)
1	1,00E+21 (5)

Tabla 6.1.1.3: Datos UFC vs tiempo.

(1) Resultados de análisis microbiológico de UFC al inicio de la inoculación.

(2) Resultados de análisis microbiológico de UFC a las 0,25 horas después de la inoculación.

(3) Resultados de análisis microbiológico de UFC a las 0,5 horas después de la inoculación.

(4) Resultados de análisis microbiológico de UFC a las 0,75 horas después de la inoculación.

(5) Resultados de análisis microbiológico de UFC a la hora después de la inoculación.

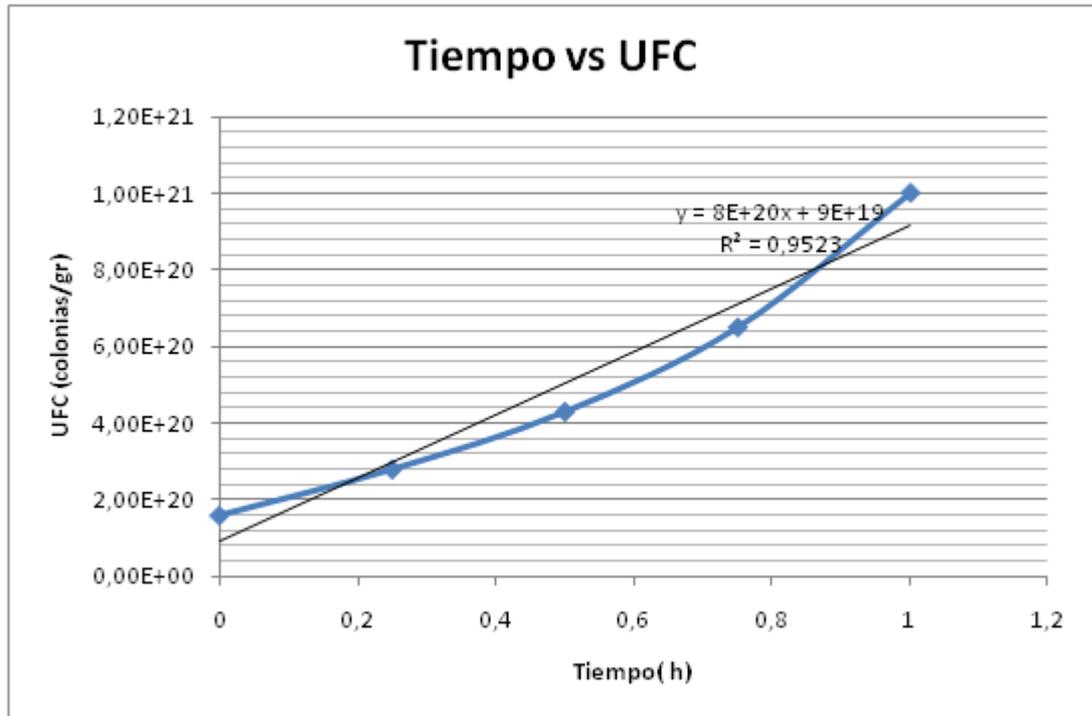


Figura 6.1.1.2: Tiempo vs UFC.

6.1.1.1 Integración de la ecuación de la recta

La integración de la ecuación de la recta se realiza con la finalidad de calcular los moles de biomasa en todo el proceso.

$$y = \int_0^1 (8E20x + 9E19)dx$$

$$y = \left[8E20 * \frac{X^2}{2} + 9E19X \right]_0^1$$

$$y = \left[\left(8E20 * \frac{1^2}{2} + 9E19 * 1 \right) - \left(8E20 * \frac{0^2}{2} + 9E19 * 0 \right) \right]$$

$$y = 4,90E20 \text{ moles de biomasa}$$

6.1.1.2 Datos obtenidos matemáticamente por medio de la integración de la ecuación de la recta para expresar el cambio de los moles de biomasa con respecto al tiempo

Tiempo	Moles de biomasa
0,25	4,75E+19
0,5	1,45E+20
0,75	2,93E+20
1	4,90E+20

Tabla 6.1.1.2.1: Datos moles de biomasa vs tiempo.

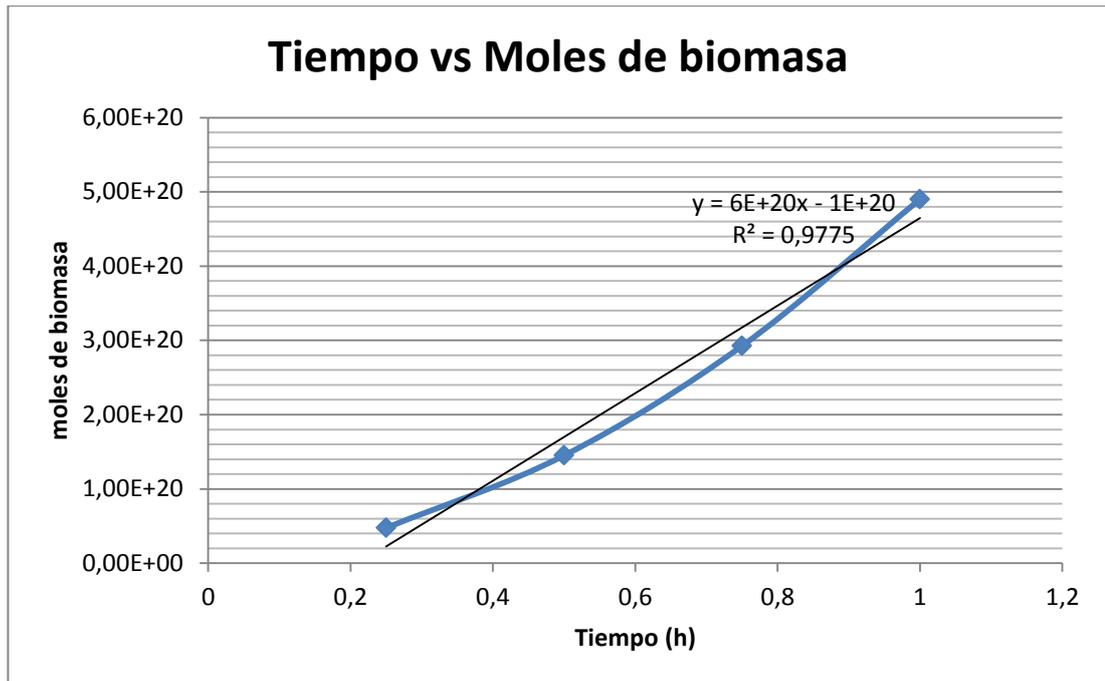


Figura 6.1.1.2.1: Tiempo vs moles de biomasa.

Interpretación:

$$y = 6E20x - 1E20$$

En donde:

y = doble de las UFC iniciales	3,20E+20
m= pendiente de la recta	6,00E+20
b = punto de corte en el eje y	-1,00E+20
x = tiempo de duplicación	7,00E-01

6.1.1.3 Desarrollo del problema de biomasa

Volumen (ml)	4000
UFC iniciales	1,60E+20
Tiempo de permanencia (h)	1

- Velocidad de flujo

$$v_f = \frac{V}{t}$$

$$v_f = \frac{4000}{1} = 4000 \frac{cc}{h}$$

- Factor de duplicación.

$$t_D = \frac{t}{x} = \frac{1}{0,7} = 1,43$$

- Crecimiento.

$$C = (\text{Concentración inicial del inóculo} * 2)^{\text{Factor de duplicación}}$$

$$C = (0,001 * 2)^{1,43} = 1,38E - 4$$

- Velocidad de flujo másico.

$$V_m = V_f * d$$

$$V_m = 4000 \frac{\text{cc}}{\text{h}} * 1,029 \frac{\text{gr}}{\text{cc}} = 4116 \frac{\text{gr}}{\text{h}}$$

- Masa del producto.

$y = \text{concentración inicial} * \text{crecimiento en moles} * \text{vel. de flujo másico}$

$$y = 0,001 * 1,38E - 4 * 4116 \frac{\text{gr}}{\text{h}} = 5,68E - 4 \frac{\text{moles}}{\text{h}}$$

6.1.2 Resultados

En el proceso de elaboración se obtuvo 1,1kg de queso fresco, utilizando 4lt de leche, sometiéndola a una temperatura de 36°C, por el lapso de 1hora, empleando un porcentaje de inoculación de 0,001%; lo que produjo 5,68 E-4 moles de biomasa que representa un total de 7,78gr de ácido láctico.

6.2 Definición de la vida de anaquel

La vida de anaquel de un alimento se puede definir como el tiempo, después de la producción o empaque, durante el cual el producto conserva ciertas características de calidad establecidas por el proveedor.

La norma INEN 1528 establece que el queso fresco deberá cumplir con los siguientes requisitos microbiológicos.

Requisitos	Unidad	Máximo	Método de Ensayo
Escherichia Coli	Colonias /gr	500	INEN 1529
Staphilococcus Aureus	Colonias /gr	1000	INEN1529
Mohos y levaduras	Colonias /gr	50000	INEN1529
Salmonella	Colonias /25gr	0	INEN 1529

Tabla 6.2.1: INEN 1528 Requisitos microbiológicos del queso fresco (lotes o partidas).

6.2.1 Determinación del tiempo de vida útil

La vida útil se estima comúnmente usando dos tipos de prueba de la estabilidad:

Pruebas en tiempo real y pruebas aceleradas. En las pruebas aceleradas de la estabilidad, el producto se almacena en condiciones elevadas de temperatura, que provocan cambios rápidos de las reacciones químicas implicadas en el deterioro del producto, siguiendo el modelo de la reacción de Arrhenius (Ecuación 6.2.1.1) el modelo indica que un aumento o la disminución de 10°C de la temperatura de un proceso homogéneo, da lugar a cambios en el producto. Y mediante esta ecuación se puede determinar las temperaturas conservación para lograr el mayor tiempo de vida útil manteniendo las características óptimas de calidad.

$$\theta_s = \theta_o * e^{-bt}$$

Ecuación 6.2.1.1: Tiempo de vida de estante a cualquier temperatura.

θ_s = Tiempo de vida de estante a cualquier temperatura

θ_o = Tiempo de vida de estante a una temperatura inicial.

b = Const. de interacción que interacciona la vida útil con la temp.

t = diferencia de temp entre un valor inicial y un valor final.

$$\ln \theta_s = \ln \theta_o - bt$$

$$y = B - mx$$

Para las pruebas de aceleración de la estabilidad, se realizó un envejecimiento acelerado a temperaturas de 4 y 14 °C realizándose controles microbiológicos y sensoriales al día de inicio, 7, 14, 21, 28; determinándose en cada uno de ellos la calidad sensorial y microbiológica con respecto a lo que establece la norma INEN 1528. Esto se hace con el fin de simular los efectos de envejecimiento en tiempo real y proporciona los datos que permiten conocer el tiempo de vida útil del producto (con y sin fermento) a una cierta temperatura.

Se obtuvo los siguientes resultados:

TEMP 4C	Día	0	7	14	21	28
	E.Coli(col/gr)	100 ⁽¹⁾	100 ⁽¹⁾	200 ⁽¹⁾	300 ⁽¹⁾	400 ⁽¹⁾
	S.Aureus(col/gr)	100 ⁽²⁾	100 ⁽²⁾	400 ⁽²⁾	500 ⁽²⁾	600 ⁽²⁾
	Hongos y levaduras(col/gr)	400 ⁽³⁾	600 ⁽³⁾	900 ⁽³⁾	1000 ⁽³⁾	20000 ⁽³⁾

TEMP 14C	Día	0	7	14	21	28
	E.Coli(col/gr)	100 ⁽⁴⁾	200 ⁽⁴⁾	400 ⁽⁴⁾	600 ⁽⁴⁾	900 ⁽⁴⁾
	S.Aureus(col/gr)	100 ⁽⁵⁾	300 ⁽⁵⁾	600 ⁽⁵⁾	700 ⁽⁵⁾	800 ⁽⁵⁾
	Hongos y levaduras(col/gr)	400 ⁽⁶⁾	900 ⁽⁶⁾	2000 ⁽⁶⁾	10000 ⁽⁶⁾	50000 ⁽⁶⁾

Tabla 6.2.1.1: Resultados análisis microbiológico queso fresco con fermento.

TEMP 4C	Día	0	7	14	21	28
	E.Coli(col/gr)	100 ⁽¹⁾	200 ⁽¹⁾	300 ⁽¹⁾	400 ⁽¹⁾	500 ⁽¹⁾
	S.Aureus(col/gr)	100 ⁽²⁾	200 ⁽²⁾	500 ⁽²⁾	700 ⁽²⁾	800 ⁽²⁾
	Hongos y levaduras(col/gr)	400 ⁽³⁾	1000 ⁽³⁾	3000 ⁽³⁾	10000 ⁽³⁾	40000 ⁽³⁾

TEMP 14C	Día	0	7	14	21	28
	E.Coli(col/gr)	100 ⁽⁴⁾	300 ⁽⁴⁾	500 ⁽⁴⁾	800 ⁽⁴⁾	1000 ⁽⁴⁾
	S.Aureus(col/gr)	100 ⁽⁵⁾	500 ⁽⁵⁾	800 ⁽⁵⁾	1000 ⁽⁵⁾	1000 ⁽⁵⁾
	Hongos y levaduras(col/gr)	400 ⁽⁶⁾	4000 ⁽⁶⁾	7000 ⁽⁶⁾	30000 ⁽⁶⁾	70000 ⁽⁶⁾

Tabla 6.2.1.2: Resultados análisis microbiológico queso fresco sin fermento.

- (1) Escherichia Coli vs tiempo (temp 4°C). Pag 78
- (2) Staphilococcus Aureus vs tiempo (4°C). Pag 79
- (3) Mohos y levaduras vs tiempo (4°C). Pag 80
- (4) Escherichia Coli vs tiempo (temp 14°C). Pag 78
- (5) Staphilococcus Aureus vs tiempo (14°C). Pag 79
- (6) Mohos y levaduras vs tiempo (temp 14°C). Pag 80

6.2.1.1 Cálculos para conocer tiempo de vida útil del queso fresco con fermento

$$\theta_s = \theta_o * e^{-bt}$$

$$y = 3,761 - 0,0515x$$

$$e^{ln\theta_o} = e^{3,761}$$

$$b = 0,0515$$

$$ln \theta_s = ln\theta_o - bt$$

$$e^{ln\theta_s} = e^{3,761 - 0,0515x}$$

$$\theta_o = 43$$

$$t = Temperatura (°C)$$

Temperatura (°C)	Tiempo de vida de estante(Días)
0	43
4	35
14	21
30	9
45	4

$$\ln \theta_s = \ln \theta_o - bt$$

$$y = 3,761 - 0,0515x$$

$$e^{\ln \theta_s} = e^{3,761 - 0,0515x}$$

Temperatura (°C)	ln(Tiempo de vida de estante)
0	3,761
4	3,555
14	3,04
30	2,216
45	1,4435

Ver anexos figuras 6.2.1.7 y 6.2.1.8.

6.2.1.2 Cálculos para conocer tiempo de vida útil del queso fresco sin fermento

$$\theta_s = \theta_o * e^{-bt}$$

$$\ln \theta_s = \ln \theta_o - bt$$

$$y = 3,6092 - 0,0693x$$

$$e^{\ln \theta_s} = e^{3,6092 - 0,0693x}$$

$$e^{\ln \theta_o} = e^{3,6092}$$

$$\theta_o = 37$$

$$b = 0,0693$$

$$t = \text{Temperatura (°C)}$$

Temperatura (°C)	Tiempo de vida de estante(Días)
0	37
4	28
14	14
30	5
45	2

$$\ln \theta_s = \ln \theta_o - bt$$

$$y = 3,6092 - 0,0693x$$

$$e^{\ln \theta_s} = e^{3,6092 - 0,0693x}$$

Temperatura (°C)	ln(Tiempo de vida de estante)
0	3,6092
4	3,332
14	2,639
30	1,5302
45	0,4907

Ver anexos figuras 6.2.1.9 y 6.2.1.10

6.3 Conclusiones

Se concluye, con la realización de éste capítulo, que la obtención de 7,78gr de ácido láctico que representa $5,68 \text{ E-}4$ moles de biomasa/h, da como resultado la inhibición de microorganismos y el consecuente incremento de la vida útil, obteniéndose así un producto con 35 días de vida útil a una temperatura de conservación de 4 °C.

Esto se comprobó, ya que una temperatura de 4°C por un lapso de 28 días, el producto presentó características sensoriales correctas y en cuanto al análisis microbiológico dio como resultado del análisis de escherichia coli, staphilococcus aureus y mohos y levaduras, 400, 600, 20000 col/gr respectivamente (tabla 31); es decir, el producto microbiológicamente se mantiene por debajo del rango máximo establecido por la norma INEN 1528 (tabla 6.2.1), lo que da a entender que el tiempo de vida útil de este producto es mayor a 28 días en tales condiciones obteniéndose un máximo de 35 días de vida útil a 4°C. Lo cual no se presenta con el producto sin fermento, ya que presenta una vida útil de 28 días a 4°C (tabla 6.2.1.2).

A la temperatura de 14°C en el día 21, las colonias/gr de E.coli llegan al límite máximo permitido por la norma INEN 1528 (tabla 6.2.1.1) mientras que las colonias/gr de S.Aureus y hongos y levaduras se mantienen dentro de los parámetros aceptables en las mismas condiciones (tabla 6.2.1.1); lo cual da a entender que el fermento cumple su función como inhibidor del crecimiento microbiano ya que aumenta su capacidad de conservación en comparación con los resultados obtenidos con los análisis del tiempo de vida útil del producto sin fermento (tabla 6.2.1.2), lo que da como consecuencia una mejora tecnológica de este producto lácteo.

CONCLUSIONES

La leche del proveedor “B” presentó un promedio de grasa y proteína de 3.76% y 3.29% respectivamente, su calidad físico-químico, microbiológica y características organolépticas fueron correctas en comparación con las normas INEN 9 2003, además no presentó reacción alguna a la prueba de antibióticos por lo que se verificó que ésta leche es apta para la aplicación y desarrollo del fermento.

Mediante la aplicación del diseño factorial completo 2^3 y tomando en cuenta el polinomio obtenido mediante el método de optimización de la máxima pendiente, se puede apreciar que el porcentaje de inoculación del fermento no es relevante, debido a que esta variable no produjo cambios significativos en la aceptación sensorial, comprobándose que lo que verdaderamente influyó es el tiempo de recorrido así como la temperatura de inoculación del fermento. Esto se debe a que el fermento produce una cantidad óptima de ácido láctico cuando las condiciones de temperatura (36°C) y tiempo de inoculación (29 min) son las adecuadas. Por lo tanto se planteó un valor medio de 0,001% como porcentaje de inoculación

A través de la determinación de las condiciones óptimas para el crecimiento del fermento R-703, en un principio se logró la disminución del pH lo que causó la disolución del fosfato coloidal y un aumento de la actividad de calcio, esto permite el acercamiento entre sí de las micelas modificadas por el cuajo y facilita la fase de agregación de las micelas y el consecuente aumento de la sinéresis para formar un gel más compacto y gomoso. A su vez las bacterias ácido lácticas contribuyeron, por medio de la generación de enzimas proteolíticas y lipolíticas, a la generación de mayor concentración de compuestos volátiles entre los que se incluyen ácidos grasos libres de cadena corta y media (que actúan como precursores de una serie de reacciones catabólicas que conducen a la formación de otros compuestos relacionados con el flavor), y junto con el metabolismo de la lactosa residual a ácido láctico favorecieron a proporcionar al queso un sabor medianamente ácido y un aroma ligeramente ácido. Características que fueron influyentes para el aumento en la aceptación sensorial del queso fresco con fermento.

Con la aplicación de los valores óptimos de las variables, se logró determinar que en 4lt de leche se produce 1,1kg de queso fresco que contienen 7,78gr de ácido láctico, con una velocidad de generación de $5,68 \text{ E-}4$ moles de biomasa/h. Con este valor de ácido láctico, la síntesis de bacteriocinas (nisina y diplococcina) y la tolerancia de las BAL a este ácido orgánico, evita que crezcan microorganismos patógenos dando como resultado el consecuente incremento de la vida útil, el cual se determinó mediante la aplicación de la ecuación de Arrhenius, obteniéndose un producto con 35 días de vida útil a una temperatura de conservación de $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Por lo que se comprueba la mejora tecnológica con la aplicación de fermentos en el queso fresco.

RECOMENDACIONES

Debido a que la mayoría de los defectos en el queso (acidificación tardía, riesgo de hinchazón, sabores texturas y olores no deseados), están relacionados con los bacteriófagos, antibióticos, mala práctica de higiene y manufactura, se recomienda verificar constantemente y mantener la calidad de la leche cruda del proveedor, así como la higiene en la planta, de tal manera que se permita el desarrollo óptimo del fermento.

Es de vital importancia que los proveedores de leche de la industria Nandito cuenten con un programa de certificación, en donde se los capacite y de asistencia técnica para el mejoramiento de pastos, sanidad del animal y procesamiento correcto de la leche, de tal manera que la materia prima sea de calidad constante y se pueda estandarizar el producto.

La producción de alimentos mejorados biotecnológicamente ayuda a mejorar los procesos, mejoran características organolépticas y aumentan el tiempo vida útil; saber las condiciones óptimas para el desarrollo dichas características implica el conocimiento del diseño experimental el cual es una herramienta fundamental de la cual se debe tener conocimiento con el objetivo de mejorar la competitividad de una empresa.

La utilización cultivos lácticos liofilizados utilizados como inóculo directo, representan una gran ventaja ya que son una solución tecnológica de rápido y fácil empleo. Pero se debe tener especial cuidado con las temperaturas de almacenamiento si se desea obtener los resultados óptimos; ya que normalmente su shelf life a una temperatura de -18°C es de 24 meses y si la temperatura de conservación es de 5°C su shelf life se reduce a 6 semanas.

BIBLIOGRAFÍA

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALAIS Ch., LACASA A. 1985. “Ciencia de la leche: principios de técnica lechera”, Traducido por Lacasa A., Editorial Reverte, S.A., Barcelona - España.
- AMIOT J., ORIA R. 1991. “Ciencia y tecnología de la leche: principios y aplicaciones”, Traducido por Rosa Oria Almudí., Editorial Acribia, S.A., Zaragoza -España.
- FALLICO V., TUMINELLO L. 2006. “Proteolysis and Microstructure of Piacentinu Ennese Cheese Made Using Different Farm Technologies”, American dairy science association, Insights Now Inc., Catania - Italy.
- GÉOSTA M., LÓPEZ A. 2003. “Manual de industrias lácteas”, Traducido por Antonio López Gómez., Editorial Mundi- Prensa Libros, S.A., Madrid - España.
- KIRK R., SAWYER R. 1999. “Composición y análisis de alimentos de pearson”, 2a. Edición en español, 1ª Reimpresión, Compañía Editorial Continental, S.A de C.V., México D.F - México.
- LARPENT J.P. 1995. “Las Fermentaciones alimentarias”, Volumen 2, Microbiología Alimentaria, Editorial Acribia S.A., Zaragoza - España.
- MAGARIÑOS H. 2001. “Producción higiénica de la leche cruda”, Producción y Servicios Incorporados S.A., Guatemala - Centroamérica.
- O'MAHONY, J.A. 2005. “Chymosin-Mediated Proteolysis, Calcium Solubilization, and Texture Development During the Ripening of Cheddar Cheese”. University of Wisconsin – Madison, Department of Food Science., Wisconsin - USA.

- PAVAN M. 2003. "Total and partial ranking methods in chemical sciences", Ph.D. Thesis in chemical sciences, University of Milano-Bicocca., Milano - Italy.
- ROBINSON R. K. 1987. "Microbiología Lactológica", Volumen II, Traducido por Sanz B. y Ordoñez J. A., Editorial Acribia, S. A., Zaragoza - España.
- ROJAS C., TRIPALDI P., NARVÁEZ H., DUTÁN H. 2006. "Optimización de algunas variables de proceso influyentes sobre las características gustativas del queso de cabra". Universidad del Azuay, Cuenca - Ecuador.
- ROMERO DEL CASTILLO R., MESTRES J. 2004. "Productos lácteos. Tecnología", Editorial UPC., Madrid - España.
- SCOTT R., TOBINSON R.K., ANDREW R. 2002. "Fabricación de queso", Traducido por Andrés Marcos Barrado., Editorial Acribia, S.A., Zaragoza - España.
- TETRA PACK PROCESSING SYSTEMS. 1995. "Dairy processing handbook", Editor Teknotext AB, Lund - Sweden.
- TODESCHINI R. 1998. "Introduzione alla Chemiometria", Edites S.R.L., Napoli - Italia.
- VALBUENA, E. 2005. "Modelos cinéticos aplicados al crecimiento de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* en leche", Facultad de ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia., Maracaibo - Venezuela.
- WALSTRA P. 2001. "Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos", Traducido por Pieter Walstra, Rosa María Oria Almudí., Editorial Acribia, S.A., Zaragoza - España.

REFERENCIAS ELECTRÓNICAS

- OBANDO C. 2010. Mónica et al. Viabilidad de los microorganismos probióticos *Lactobacillus casei* 01, *Lactobacillus acidophilus* La-5, *Bifidobacterium* BB12 durante el almacenamiento de queso cottage. *Vitae* [online], vol.17, n.2 [cited 2011.03.26], pp.141.148. Available from: <http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-40042010000200005&lng=en&nrm=iso>. ISSN 0121-4004.
- PEREZ-CHABELA. 2008. María de Lourdes; TOTOSAUS, Alfonso y GUERRERO, Isabel. Evaluation of thermotolerant capacity of lactic acid bacteria isolated from commercial sausages and the effects of their addition on the quality of cooked sausages. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* [online]. vol.28, n.1 [citado 2011.03.26], pp.132138. Disponible en: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010120612008000100019&lng=es&nrm=iso>. ISSN 0101-2061.
- RED DE REVISTAS CIENTÍFICAS DE AMÉRICA LATINA Y DEL CARIBE, ESPAÑA Y PORTUGAL. 2005. Producción Biotecnológica de ácido láctico-Estado del arte, Ciencia y Tecnología alimentaria, Sociedad Mexicana de Nutrición y Tecnología de Alimentos, Reynosa, México, Diciembre, vol5, número 001. Disponible en internet: www.altaga.org/cyta. ISSN 1135-8122.
- SANCHEZ R. 2007. Nedher; RAMIREZ L., Diana M. and ZAPATA Z., Arley D.. Evaluación de un sistema de fermentación extractiva para la producción de ácido láctico utilizando suero de leche como sustrato. *Vitae* [online], vol.14, n.2 [cited 2011.03.26], pp.2734. Available from: <http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S012140042007000200004&lng=en&nrm=iso>. ISSN 0121-4004.

- SUAREZ M. 2008. Héctor; FRANCISCO, Alicia de and BEIRAO, Luiz H. Influencia de bacteriocinas producidas por *Lactobacillus plantarium* LPBM10 sobre la vida útil de filetes del híbrido de cachama *Piaractus brachypomus* x *Colossoma macropomum* empacado al vacío. *Vitae* [online], vol.15, n.1 [2011.03.26], pp.32/40. Available from: <http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-40042008000100005&lng=en&nrm=iso>. ISSN 0121-4004.

ANEXOS

Anexo 1:

- **Análisis de leche cruda A**

Muestra 1A									
Fecha	Grasa	SN Grasos	S.totales	Densidad	Agua	Proteína	Ph	°D	Día
05/01/2011	3,85	8,45	12,3	27,83	52,11	3,19	6,48	17,9	1
06/01/2011	3,18	8,8	11,98	28,83	52,1	3,31	6,42	18,9	2
11/01/2011	4,74	8,65	13,39	27,84	52,23	3,28	6,37	19,7	3
12/01/2011	3,14	8,49	11,63	28,62	52,8	3,2	6,44	18,7	4
Promedio	3,72	8,59	12,325	28,28	52,31	3,24	6,43	18,8	
Muestra 2A									
Fecha	Grasa	SN Grasos	S.totales	Densidad	Agua	Proteína	Ph	°D	Día
05/01/2011	2,95	8,72	11,67	29,71	52,1	3,28	6,44	18,6	1
06/01/2011	4,08	8,62	12,7	28,31	52,1	3,26	6,49	17,8	2
11/01/2011	3,54	8,28	11,82	27,42	51,3	3,13	6,45	18,6	3
12/01/2011	3,71	8,49	11,63	28,62	51,1	3,28	6,41	19	4
Promedio	3,57	8,52	11,95	28,515	51,65	3,23	6,45	18,5	
Muestra 4A									
Fecha	Grasa	SN Grasos	S.totales	Densidad	Agua	Proteína	Ph	°D	Día
05/01/2011	3,98	8,66	12,64	28,55	52,15	3,27	6,46	18,3	1
06/01/2011	3,8	8,67	12,47	28,76	52,1	3,27	6,43	18,7	2
11/01/2011	3,59	8,59	12,18	28,62	52,3	3,24	6,4	18,8	3
12/01/2011	3,46	8,44	11,9	28,13	52,3	3,18	6,48	18,1	4
Promedio	3,7	8,59	12,29	28,51	52,21	3,24	6,44	18,5	

Cuadro 1: Análisis físico químico leche cruda A.

Muestra 1A		
Fecha	Antibióticos	Prueba del Alcohol
05/01/2011	Presuntamente positivo	Negativo
06/01/2011	Negativo	Negativo
11/01/2011	Negativo	Positivo
Muestra 2A		
Fecha	Antibióticos	Prueba del Alcohol
05/01/2011	Negativo	Negativo
06/01/2011	Negativo	Negativo
11/01/2011	Negativo	Negativo
Muestra 4A		
Fecha	Antibióticos	Prueba del Alcohol
05/01/2011	Negativo	Positivo
06/01/2011	Negativo	Negativo
11/01/2011	Negativo	Negativo

Cuadro2: Análisis antibióticos y prueba del alcohol de leche cruda A.

Muestra 1A			
Fecha	Color	Olor	Aspecto
05/01/2011	Característico	Característico	Característico
06/01/2011	Característico	Ligeramente ácido	Característico
11/01/2011	Característico	Ligeramente ácido	Característico
Muestra 2A			
Fecha	Color	Olor	Aspecto
05/01/2011	Característico	Característico	Característico
06/01/2011	Característico	Característico	Característico
11/01/2011	Característico	Ligeramente ácido	Característico
Muestra 4A			
Fecha	Color	Olor	Aspecto
05/01/2011	Característico	Ligeramente ácido	Característico
06/01/2011	Característico	Característico	Característico
11/01/2011	Característico	Característico	Característico

Cuadro3: Análisis organolépticos de leche cruda A.

Muestra 1A			
Fecha	TRAM	Categoría	Contenido de Microorganismos aerobios mesófilos
05/01/2011	2h 2min	(b) regular	Desde 5x ⁵ E5 hasta 1,5E5
06/01/2011	3h 32min	(b) regular	Desde 5x ⁵ E5 hasta 1,5E5
11/01/2011	45min	(c) mala	Desde 1,5x ⁶ E6 hasta 5E6
12/01/2011	2h 14min	(b) regular	Desde 5x ⁵ E5 hasta 1,5E5
Muestra 2A			
Fecha	TRAM	Categoría	Contenido de Microorganismos aerobios mesófilos
05/01/2011	1h 2min	(c) mala	Desde 1,5x ⁶ E6 hasta 5E6
06/01/2011	1h 15min	(c) mala	Desde 1,5x ⁶ E6 hasta 5E6
11/01/2011	1h 3min	(c) mala	Desde 1,5x ⁶ E6 hasta 5E6
12/01/2011	51min	(c) mala	Desde 1,5x ⁶ E6 hasta 5E6
Muestra 4A			
Fecha	TRAM	Categoría	Contenido de Microorganismos aerobios mesófilos
05/01/2011	4h 32min	(b) regular	Desde 5x ⁵ E5 hasta 1,5E5
06/01/2011	1h 45min	(c) mala	Desde 1,5x ⁶ E6 hasta 5E6
11/01/2011	1h 30min	(c) mala	Desde 1,5x ⁶ E6 hasta 5E6
12/01/2011	1h 25min	(c) mala	Desde 1,5x ⁶ E6 hasta 5E6

Muestra 1A			Muestra 4A		
Fecha	Bacterias totales	Categoría	Fecha	Bacterias totales	Categoría
05/01/2011	1,00E+08	(d) muy mala	05/01/2011	2,00E+07	(d) muy mala
06/01/2011	2,00E+07	(d) muy mala	06/01/2011	3,00E+07	(d) muy mala
11/01/2011	4,00E+08	(d) muy mala	11/01/2011	2,00E+08	(d) muy mala
12/01/2011	3,00E+08	(d) muy mala	12/01/2011	2,00E+08	(d) muy mala

Cuadro 4: Análisis microbiológico de leche cruda A.

• Análisis de leche cruda B.

Muestra 1B									
Fecha	Grasa	SN Grasos	S.totales	Densidad	Agua	Proteína	ph	'D	Día
01/01/2011	3,09	8,95	12,04	30,52	53	3,37	6,4	16	1
02/01/2011	3,7	8,86	12,56	29,61	53	3,34	6,48	16	2
03/01/2011	3,58	8,65	12,23	28,87	52	3,26	6,44	16	3
04/01/2011	3,61	8,7	12,31	29,05	52	3,28	6,49	17,9	4
05/01/2011	3,38	8,66	12,04	29,09	53	3,27	6,45	16	5
06/01/2011	3,25	8,76	12,01	29,61	57,6	3,3	6,54	17	6
07/05/2010	3,52	8,76	12,28	29,37	53	3,3	6,45	18,3	7
08/01/2011	2,86	8,69	11,55	29,67	53	3,27	6,52	17,4	8
09/01/2011	3,79	8,7	12,49	28,88	53	3,28	6,54	17,1	9
10/01/2011	3,48	8,4	11,88	27,96	55,24	3,17	6,17	16	10
11/01/2011	3,84	8,53	12,37	28,16	53	3,22	6,39	16	11
12/01/2011	4,15	8,66	12,81	28,4	56,7	3,27	6,42	15,8	12
13/01/2011	3,63	8,73	12,36	29,15	53	3,29	6,45	15,8	13
14/01/2011	3,84	8,71	12,55	28,88	53	3,29	6,45	16	14
15/01/2011	3,72	8,64	12,36	28,71	52	3,26	6,52	17,4	15
16/01/2011	3,84	8,8	12,64	29,24	53	3,32	6,47	15,5	16
17/01/2011	3,47	8,89	12,36	29,93	58,37	3,35	7,01	7,8	17
18/01/2011	3,51	8,78	12,29	29,46	53	3,31	6,46	16	18
19/01/2011	3,62	8,81	12,43	29,48	53	3,32	6,45	16	19
Promedio	3,57	8,72	12,29	29,16	53,68	3,29	6,48	16	

Muestra 2B									
Fecha	Grasa	SN Grasos	S.totales	Densidad	Agua	Proteína	ph	'D	Día
01/01/2011	3,76	8,73	12,49	29,03	56,67	3,29	6,43	16	1
02/01/2011	3,58	8,76	12,34	29,31	53	3,3	6,52	15,8	2
03/01/2011	3,69	8,76	12,45	29,22	53	3,31	6,49	15,4	3
04/01/2011	3,6	8,59	12,19	28,61	53,61	3,24	6,49	15,8	4
05/01/2011	4,13	8,84	12,97	29,14	53,05	3,34	6,5	15,6	5
06/01/2011	3,81	8,85	12,66	29,47	53	3,34	6,52	15,5	6
07/01/2011	4,4	8,8	13,2	28,74	53,32	3,33	6,51	15,5	7
08/01/2011	3,85	8,79	12,64	29,19	53	3,32	6,49	15,5	8
09/01/2011	3,71	8,61	12,32	28,59	53	3,25	6,5	17,7	9
10/01/2011	4,42	8,49	12,91	27,48	55,26	3,21	6,43	15,4	10
11/01/2011	3,39	8,75	12,14	29,44	53	3,3	6,42	15,5	11
12/01/2011	4,02	8,77	12,79	28,96	53	3,31	6,51	17,6	12
13/01/2011	3,81	8,73	12,54	28,99	52,51	3,3	6,43	15,5	13
14/01/2011	3,81	8,85	12,66	29,47	53	3,34	6,44	15,5	14
15/01/2011	4	8,79	12,79	29,06	53	3,32	6,48	15,3	15
16/01/2011	4,07	8,55	12,62	28,03	53	3,23	6,52	15,8	16
17/01/2011	4,06	8,63	12,69	28,36	53	3,26	6,63	15,8	17
18/01/2011	4,03	8,64	12,67	28,43	56,68	3,26	6,46	15,5	18
19/01/2011	3,62	8,81	12,43	29,48	53,00	3,32	6,45	15,5	19
Promedio	3,88	8,72	12,61	28,89	53,53	3,29	6,49	15,8	

Muestra 3B									
Fecha	Grasa	SN Grasos	S.totales	Densidad	Agua	Proteina	pH	*D	Día
01/01/2011	3,62	8,63	12,25	28,75	53,11	3,26	6,48	16	1
02/01/2011	3,86	8,84	12,7	29,39	53,1	3,34	6,48	15,8	2
03/01/2011	4,08	8,79	12,87	28,99	52	3,32	6,47	16	3
04/01/2011	3,83	8,79	12,62	29,21	53,1	3,32	6,5	16	4
05/01/2011	3,6	8,69	12,29	29,01	52	3,28	6,52	15,8	5
06/01/2011	3,71	9	12,71	30,16	52	3,39	6,53	16	6
07/01/2011	3,77	8,9	12,67	29,71	53	3,36	6,53	16	7
08/01/2011	3,44	8,78	12,22	29,52	57,6	3,31	6,55	16	8
09/01/2011	3,87	8,62	12,49	28,49	53	3,26	6,52	17,4	9
10/01/2011	3,73	8,41	12,14	27,77	55,6	3,18	6,42	16	10
11/01/2011	4,25	8,75	13	28,68	53	3,31	6,52	17,4	11
12/01/2011	3,94	8,73	12,67	28,87	53	3,3	6,48	16	12
13/01/2011	3,94	8,78	12,72	29,07	53	3,31	6,49	15,8	13
14/01/2011	3,78	8,62	12,4	28,57	52,1	3,25	6,47	15,8	14
15/01/2011	3,79	8,62	12,41	28,56	57,55	3,25	6,47	15,8	15
16/01/2011	3,86	8,88	12,74	29,55	53	3,35	6,49	16	16
17/01/2011	4,23	8,86	13,09	29,14	56,54	3,35	6,53	16	17
18/01/2011	4,01	8,65	12,66	28,49	53	3,27	6,51	15,8	18
19/01/2011	3,62	8,81	12,43	29,48	53	3,32	6,45	15,8	19
Promedio	3,84	8,74	12,58	29,02	53,62	3,3	6,5	16	

Cuadro5: Análisis físico químico leche cruda B.

Fecha	Antibióticos	Prueba del Alcohol
13/01/2011	Negativo	Negativo
17/01/2011	Negativo	Negativo
18/01/2011	Negativo	Negativo
19/01/2011	Negativo	Negativo
Muestra 2B		
Fecha	Antibióticos	Prueba del Alcohol
13/01/2011	Negativo	Negativo
17/01/2011	Negativo	Negativo
18/01/2011	Negativo	Negativo
19/01/2011	Negativo	Negativo
Muestra 3B		
Fecha	Antibióticos	Prueba del Alcohol
13/01/2011	Negativo	Negativo
17/01/2011	Negativo	Negativo
18/01/2011	Negativo	Negativo
19/01/2011	Negativo	Negativo

Cuadro 6: Análisis antibióticos y prueba del alcohol de leche cruda B.

Muestra 1B			
Fecha	TRAM	Categoría	Contenido de Microorganismos aerobios mesófilos
13/01/2011	2h 20min	(b) regular	Desde 5xE5 hasta 1,5E5
17/01/2011	2h 30min	(b) regular	Desde 5xE5 hasta 1,5E5
18/01/2011	2h 18min	(b) regular	Desde 5xE5 hasta 1,5E5
19/01/2011	2h 14min	(b) regular	Desde 5xE5 hasta 1,5E5
Muestra 2B			
Fecha	TRAM	Categoría	Contenido de Microorganismos aerobios mesófilos
13/01/2011	2h 15min	(b) regular	Desde 5xE5 hasta 1,5E5
17/01/2011	2h 14min	(b) regular	Desde 5xE5 hasta 1,5E5
18/01/2011	2h 2min	(b) regular	Desde 5xE5 hasta 1,5E5
19/01/2011	2h 14min	(b) regular	Desde 5xE5 hasta 1,5E5
Muestra 3B			
Fecha	TRAM	Categoría	Contenido de Microorganismos aerobios mesófilos
13/01/2011	2h 10min	(b) regular	Desde 5xE5 hasta 1,5E5
17/01/2011	2h 17min	(b) regular	Desde 5xE5 hasta 1,5E5
18/01/2011	2h 6min	(b) regular	Desde 5xE5 hasta 1,5E5
19/01/2011	2h 14min	(b) regular	Desde 5xE5 hasta 1,5E5

Muestra 2B			Muestra 3B		
Fecha	Bacterias totales	Categoría	Fecha	Bacterias totales	Categoría
13/01/2011	4,00E+05	(a)buena	13/01/2011	1,00E+05	(a)buena
17/01/2011	4,00E+05	(a)buena	17/01/2011	2,00E+05	(a)buena
18/01/2011	7,00E+05	(b)regular	18/01/2011	6,00E+05	(b)regular
19/01/2011	3,00E+05	(a)buena	19/01/2011	4,00E+05	(a)buena

Cuadro 7: Análisis microbiológico de leche cruda B.

Muestra 1B			
Fecha	Color	Olor	Aspecto
13/01/2011	Característico	Característico	Característico
17/01/2011	Característico	Característico	Característico
18/01/2011	Característico	Característico	Característico
19/01/2011	Característico	Característico	Característico
Muestra 2B			
Fecha	Color	Olor	Aspecto
13/01/2011	Característico	Característico	Característico
17/01/2011	Característico	Característico	Característico
18/01/2011	Característico	Característico	Característico
19/01/2011	Característico	Característico	Característico
Muestra 3B			
Fecha	Color	Olor	Aspecto
13/01/2011	Característico	Característico	Característico
17/01/2011	Característico	Característico	Característico
18/01/2011	Característico	Característico	Característico
19/01/2011	Característico	Característico	Característico

Cuadro 8: Análisis organolépticos de leche cruda B.

- **Datos de análisis físico químicos y microbiológicos para evaluar la calidad de leche pasteurizada de la industria Nandito.**

Fecha	Bacterias totales	Categoría
20/01/2011	3,00E+04	(a)buena
31/01/2011	1,00E+03	(a)buena
01/01/2011	1,00E+03	(a)buena
02/01/2011	6,00E+02	(a)buena
03/01/2011	3,00E+04	(a)buena

Cuadro 9: Análisis microbiológico de leche pasteurizada.

Fecha	Grasa	SN Grasos	S.totales	Densidad	Agua	Proteína	Ph	'D	Días
20/01/2011	3,83	8,57	12,4	28,3	53,11	3,24	6,38	16	1
31/01/2011	3,73	8,51	12,24	28,2	53,1	3,21	6,42	16	2
01/01/2011	3,61	8,53	12,14	28,4	53,23	3,22	6,44	15,8	3
02/01/2011	3,6	8,4	12	27,8	53,8	3,17	6,48	16	4
03/01/2011	3,76	8,6	12,36	28,5	53,6	3,25	6,43	16,2	5
Promedio	3,7	8,52	12,22	28,24	53,37	3,21	6,43	16	

Cuadro 10: Análisis físico químico de leche pasteurizada.

Fecha	Color	Olor	Aspecto
20/01/2011	Característico	Característico	Característico
31/01/2011	Característico	Característico	Característico
01/01/2011	Característico	Característico	Característico
02/01/2011	Característico	Característico	Característico
03/01/2011	Característico	Característico	Característico

Cuadro 11: Análisis organoléptico de leche pasteurizada

Anexo 2:

$$X = \begin{bmatrix} +1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ +1 & -1 & -1 & +1 & +1 & +1 \\ +1 & +1 & -1 & -1 & +1 & +1 \\ +1 & +1 & +1 & +1 & +1 & +1 \\ +1 & -1 & +1 & -1 & +1 & +1 \\ +1 & -1,414 & 0 & 0 & +1,999 & 0 \\ +1 & 0 & -1,414 & 0 & 0 & +1,999 \\ +1 & +1,414 & 0 & 0 & +1,999 & 0 \\ +1 & 0 & +1,414 & 0 & 0 & +1,999 \end{bmatrix} \quad Y = \begin{bmatrix} 0,3333 \\ 0,6517 \\ 0,5133 \\ 0,3817 \\ 0,3542 \\ 0,3125 \\ 0,5208 \\ 0,4375 \\ 0,4375 \end{bmatrix} \quad b = \begin{bmatrix} 0,3333 \\ 0,0082 \\ -0,0684 \\ 0,0415 \\ 0,0329 \\ 0,0850 \end{bmatrix}$$

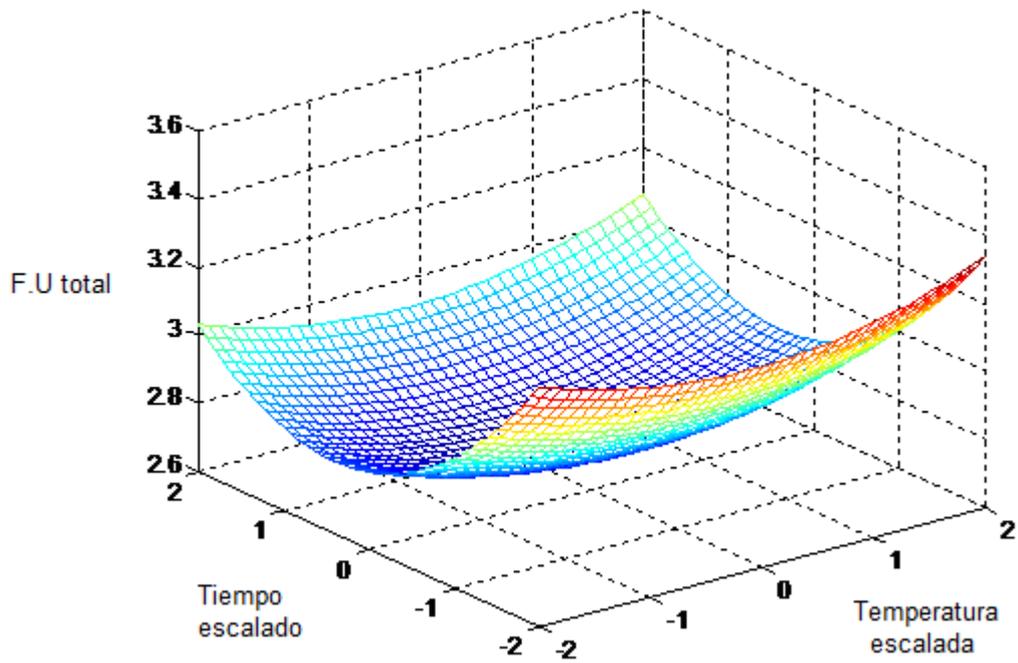


Figura 5.10.1: Superficie de respuesta polinomial por el método del diseño central compuesto.

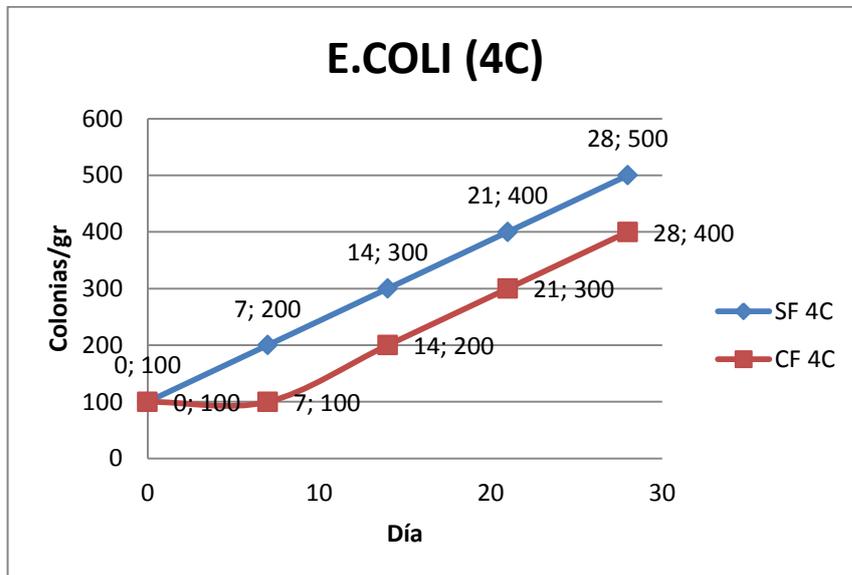


Figura 6.2.1.1: Escherichia Coli vs tiempo (temperatura 4°C).

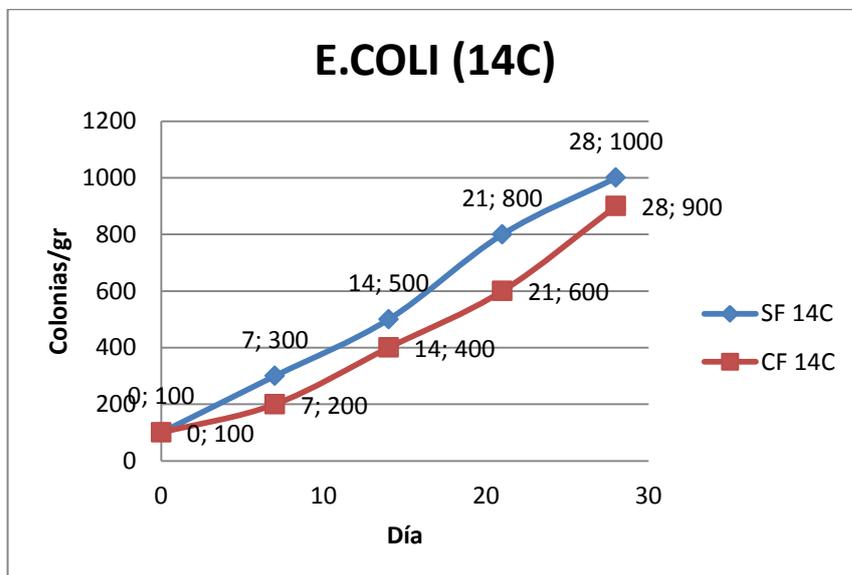


Figura 6.2.1.2: Escherichia Coli vs tiempo (temperatura 14°C).

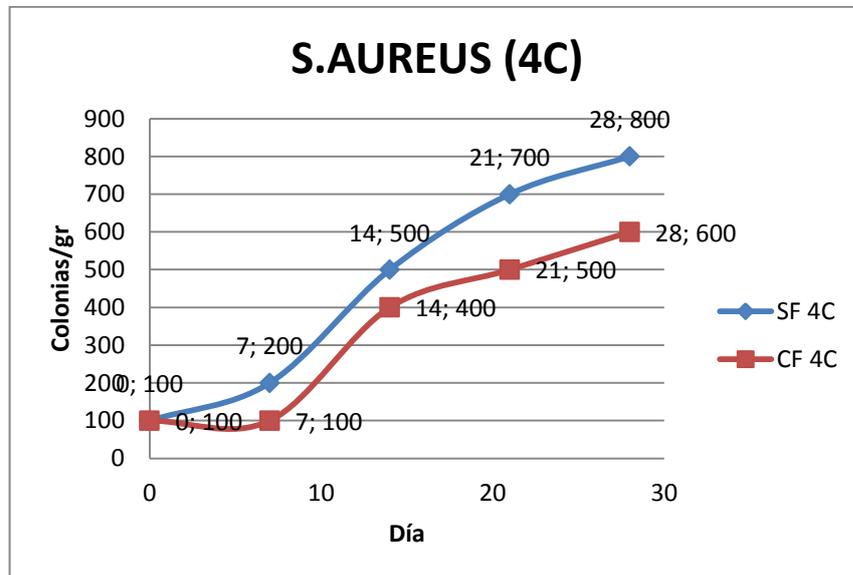


Figura 6.2.1.3: Staphilococcus Aureus vs tiempo (temperatura 4°C).

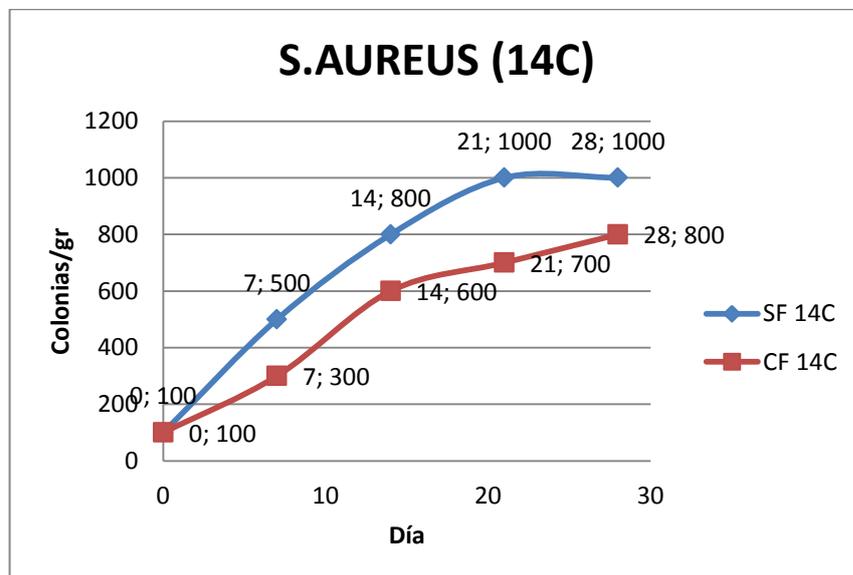


Figura 6.2.1.4: Staphilococcus Aureus vs tiempo (temperatura 14°C).

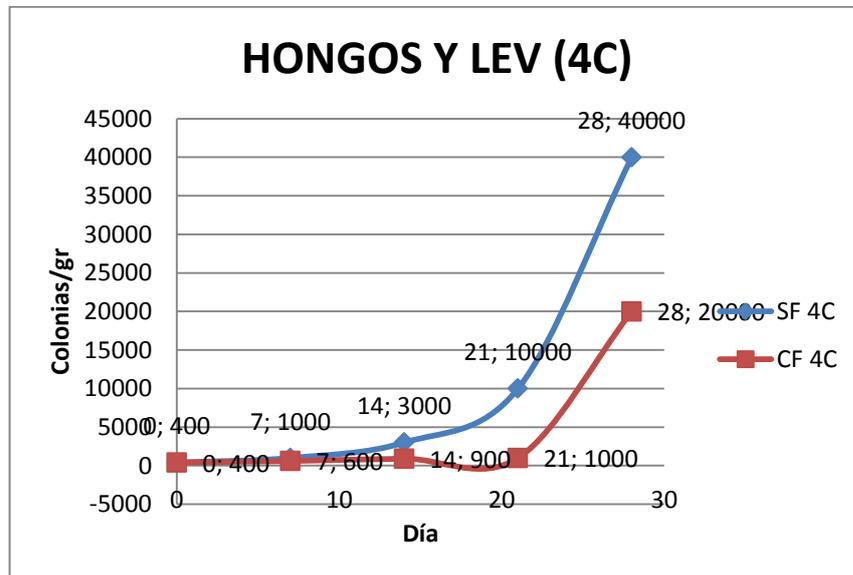


Figura 6.2.1.5: Mohos y Levaduras vs tiempo (temperatura 4°C).

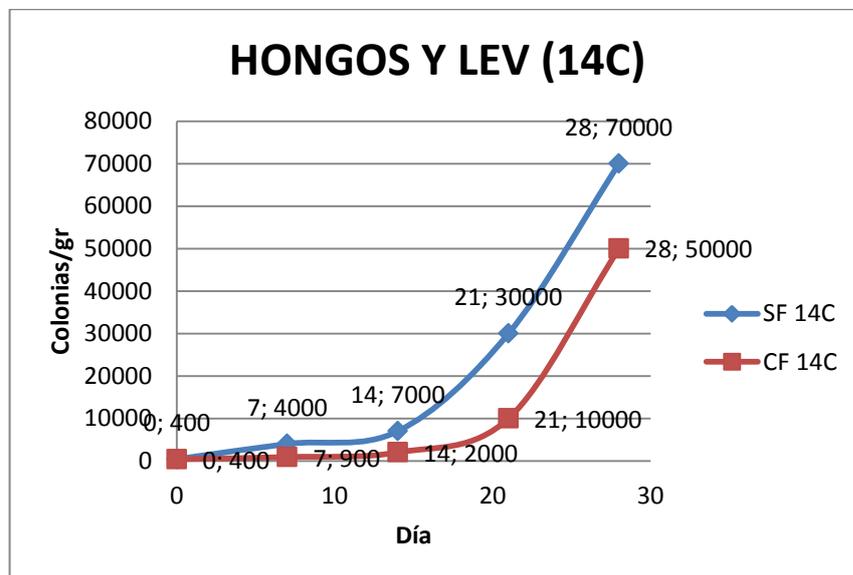


Figura 6.2.1.6 Mohos y Levaduras vs tiempo (temperatura 14°C).

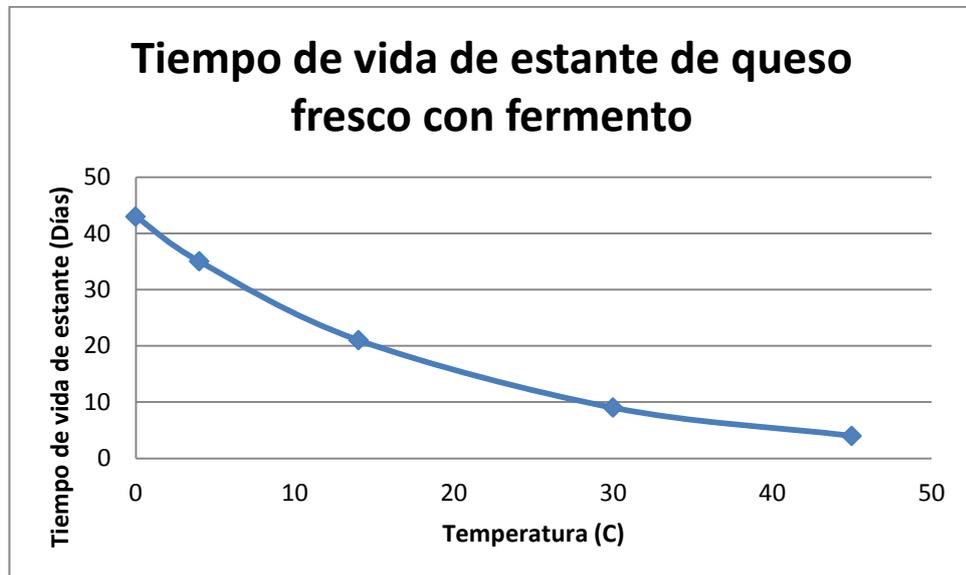


Figura 6.2.1.7: Tiempo de vida de estante de queso fresco con fermento.

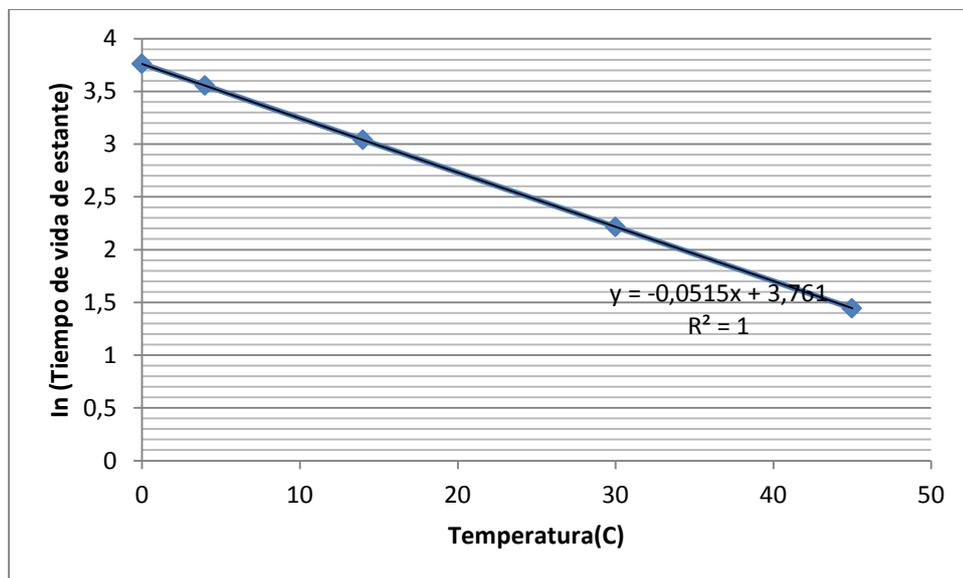


Figura 6.2.1.8: In(tiempo de vida de estante) vs temperatura (queso con fermento).

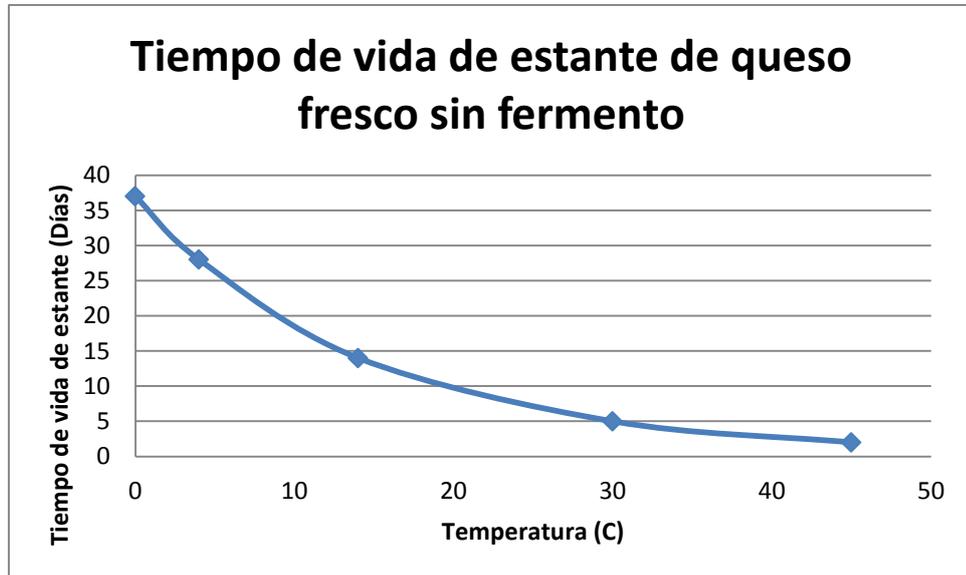


Figura 6.2.1.9: Tiempo de vida de estante de queso fresco sin fermento.

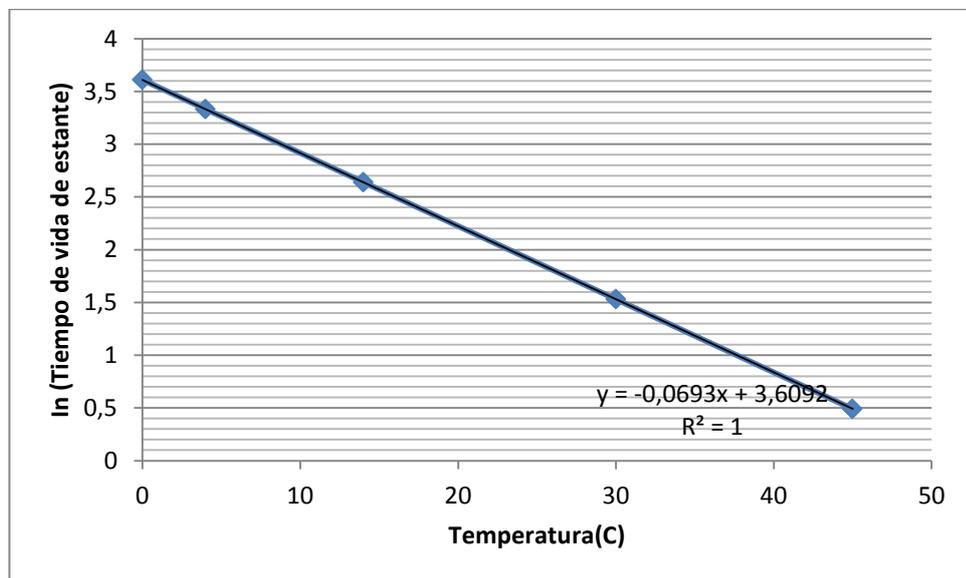


Figura 6.2.1.10: In (tiempo de vida de estante) vs temperatura (queso sin fermento).

