



Universidad del Azuay

Facultad de Ciencia y Tecnología

Escuela de Ingeniería en Alimentos

**“ESTUDIO PARA OPTIMIZAR LA CALIDAD TECNOLÓGICA Y
SENSORIAL DEL HELADO TIPO MANTECADO CON
HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA MEDIANTE DISEÑO
EXPERIMENTAL”**

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

**Autores: Jessica Lazo Bustamante
Priscila Verdugo Tenesaca**

Director: Ing. Cristian Rojas Villa

**Cuenca, Ecuador
2010**

DEDICATORIA

A mi madre por su gran cariño y paciencia, por ser mi amiga y ayudarme en cada momento de mi vida, por enseñarme a luchar y haber hecho de mi lo que soy ahora, a mi padre por brindarme su confianza, apoyo y ayuda en cada meta alcanzada. A mis hermanas por estar conmigo siempre, dándome palabras de aliento para salir adelante. A toda mi familia por su afecto y comprensión.

Quien les quiere

Jessica

DEDICATORIA

Has sabido ser la luz que siempre ha iluminado el sendero por recorrer, tu ausencia ha sido inmensa, pero la lección aprendida ha sido el día a día. Ninguna meta, ningún camino, ningún sueño cumplido se puede alcanzar sin que hayan tenido paciencia, palabras justas, apoyo incondicional y sabiduría para hacer de mí, lo que soy hoy...

...es tan grande el sentir, que no cabe en mis palabras,

Mi corazón entero y el mérito alcanzado, para ustedes.

Gracias

Priscila

AGRADECIMIENTO

Al Ing. Cristian Rojas por su paciencia y apoyo constante para la realización de esta tesis, por brindarnos su amistad y conocimientos, convirtiéndose en un aporte fundamental para la ejecución de este trabajo.

A nuestros distinguidos profesores por su dedicación y apoyo en cada hora de clases.

A la empresa Dulce Compañía por confiar en nosotras y por darnos las herramientas necesarias para llevar adelante este proyecto.

A todos nuestros amigos por su apoyo y ayuda, ya que de una u otra forma contribuyeron en la realización de este trabajo.

Jessica - Priscila

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue optimizar las características sensoriales y tecnológicas del helado tipo mantecado comercializado por la empresa “Dulce Compañía” Cía. Ltda.

El trabajo comprendió dos etapas: 1) optimización de la hidrólisis enzimática de la lactosa y 2) optimización del proceso y producto. Para la primera etapa se utilizó un diseño factorial completo; el cual fue optimizado utilizando el método de máxima pendiente. En la segunda etapa se utilizó un diseño de mezclas combinando las variables del proceso, para establecer el producto que presente la mejor aceptación, mayor rendimiento y menor costo. La evaluación de la aceptabilidad del producto fue desarrollada por un panel de catadores semi-entrenados. Como resultado principal se mejoraron las características sensoriales y tecnológicas del producto terminado, estableciendo las condiciones óptimas de su elaboración.

ABSTRACT

The aim of the present work was to optimize the sensorial and technological features of the ice cream developed by “Dulce Compañía” Cía. Ltda.

The experimental work was performed in two stages: 1) optimization of lactose enzymatic hydrolysis, and 2) optimization of the process and product. For the first stage a complete factorial design was developed, optimized using the maximum slope method. In the second stage a mixture design was performed, combining the process variables. The product with the best acceptance, high yield and low cost was selected. The acceptance of the product was developed by a semi-trained taster’s panel. As a main result the sensorial and technological features of the final product were improved, establishing the optimum parameters for its elaboration.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iv
RESUMEN.....	v
ABSTRACT	vi
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vii
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES Y CUADROS	xi
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xiv
INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO I: EL HELADO	3
1.1. Definición	3
1.2. Clasificación de los helados	3
1.3. Componentes básicos del helado	5
1.3.1. Leche y productos lácteos.....	5
1.3.2. Grasas	5
1.3.3. Proteínas vegetales	6
1.3.4. Aire	6
1.3.5. Agua	6
1.3.6. Hidratos de carbono.....	7
1.3.7. Estabilizantes y emulsionantes	10
1.3.8. Frutas.....	11
1.4. Equilibrio de la mezcla de helado.....	11
1.4.1. Agua-sólidos	11
1.4.2. Sólidos entre sí	12
1.4.3. Temperatura de servicio.....	12
1.5. Tecnología de los helados	12
1.5.1. Maquinaria y equipos	12
1.5.2. Diagrama de flujo.....	19
1.5.3. Proceso productivo	19

CAPITULO II: ENZIMOLOGÍA	22
2.1. Definición	22
2.2. Funciones de las enzimas	22
2.3. Clasificación de las enzimas y nomenclatura	23
2.3.1. Oxidorreductasas	23
2.3.2. Transferasas	24
2.3.3. Hidrolasas	24
2.3.4. Liasas	24
2.3.5. Isomerasas	25
2.3.6. Ligasas	25
2.4. Especificidad de las enzimas	25
2.5. Sitio activo de las enzimas	26
2.6. Cinética de las reacciones químicas	29
2.6.1. Velocidad de reacción	29
2.6.2. Energía de activación	29
2.6.3. Efecto de la temperatura	29
2.6.4. Efecto del pH	30
2.6.5. Concentración de enzima	31
2.6.6. Concentración de sustrato	31
2.7. Aplicaciones industriales	32
2.7.1. Carbohidrasas	32
2.7.2. Lipasas	35
2.7.3. Proteasas	36
CAPITULO III: BIOTECNOLOGÍA DE LA HIDRÓLISIS	38
3.1. Hidrólisis enzimática	38
3.2. Hidrólisis de la lactosa	38
3.3. Hidrólisis industrial	40
3.4. Métodos para la determinación de la hidrólisis de la lactosa	40
3.4.1. Método de Fehling	41
3.4.2. Método de Benedict	41
3.4.3. Método de Somogyi	42
3.4.4. Método de HPLC	43
3.4.5. Crioscopia	43
3.5. Ventajas de la hidrólisis de la lactosa	45

3.5.1.	Incremento en el poder edulcorante.....	45
3.5.2.	Incremento en la solubilidad.....	46
3.5.3.	Incremento de azúcares fermentables	46
3.5.4.	Otras ventajas.....	46
CAPITULO IV: DISEÑO EXPERIMENTAL.....		47
4.1.	Introducción	47
4.2.	Generalidades del diseño experimental	48
4.3.	Objetivos del diseño experimental.....	49
4.4.	Ventajas del diseño experimental.....	50
4.5.	Etapas de un diseño experimental	50
4.5.1.	Análisis del problema	51
4.5.2.	Planificación de los experimentos	51
4.5.3.	Ejecución de los experimentos.....	52
4.5.4.	Tratamiento estadístico de los datos y análisis de resultados	53
4.6.	Escalado de las variables.....	53
4.7.	Diseño factorial a dos niveles y “k” factores	54
4.7.1.	Descripción	56
4.8.	Cálculo del modelo de regresión	57
4.9.	Determinación de los efectos significativos	59
4.9.1.	Error experimental.....	59
4.9.2.	Normal probability plots.....	61
4.10.	Optimización	63
4.10.1.	Método de superficie de respuesta	64
4.10.2.	Método de la máxima pendiente	66
4.11.	Diseño experimental de mezclas.....	67
4.11.1.	Diagnóstico y selección de los modelos optimales	68
4.11.2.	Diseño de simplex lattice.....	75
4.11.3.	Coeficientes polinomiales como funciones de las respuestas en los puntos de los lattices	80
4.12.	Diseño de mezclas con variables de proceso.....	84
4.12.1.	Ajuste de un modelo cuadrático mixto en presencia de variables de proceso.....	85
4.13.	Función utilidad.....	91

CAPITULO V: RESULTADOS Y DISCUSIONES	94
5.1. Etapa 1: Hidrólisis enzimática de la lactosa	94
5.2. Etapa 2: Optimización del proceso y producto	101
CONCLUSIONES	114
BIBLIOGRAFÍA	115
ANEXOS	122

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES Y CUADROS

Tabla 1.1: Poder anticongelante de algunos azúcares.....	8
Tabla 1.2: Crema blanca.....	9
Tabla 1.3: Relación: temperatura de almacenamiento y el poder anticongelante.....	9
Tabla 2.1: Dosificación de Maxilact L 2000.....	34
Tabla 4.1: Número de experimentos para n niveles y k factores.....	52
Tabla 4.2: Matriz del diseño a dos niveles para 1, 2, 3 y 4 variables.....	55
Tabla 4.3: Matriz del diseño para 2 niveles y 3 factores.....	57
Tabla 4.4: Matriz del modelo para 2 niveles y 3 factores.....	57
Tabla 4.5: Diseño central compuesto a 2 niveles y 2 variables.....	65
Tabla 4.6: El número de términos en el polinomio canónico.....	80
Tabla 4.7: Nomenclatura de las respuestas de Scheffé.....	81
Tabla 4.8: Valores de vinilo grueso de las seis mezclas plastificantes.....	87
Tabla 4.9: ANOVA.....	90
Tabla 5.1: Variables y condiciones experimentales.....	94
Tabla 5.2: Valores del punto crioscópico de las muestras iniciales.....	95
Tabla 5.3: Valores del punto crioscópico de la muestra luego de la hidrólisis.....	95
Tabla 5.4: Matriz del modelo y porcentaje de hidrólisis.....	97
Tabla 5.5: Coeficientes de la regresión y error experimental.....	97
Tabla 5.6: Parámetros para el cálculo del error expandido.....	97
Tabla 5.7: Tabla para el half-normal Plot.....	98
Tabla 5.8: Variables y condiciones experimentales para la optimización.....	99
Tabla 5.9: Resultados para optimización.....	100
Tabla 5.10: Porcentaje de hidrólisis a diferentes valores de k	101
Tabla 5.11: Porcentaje de hidrólisis en las mismas condiciones y con $k=0,01$	101
Tabla 5.12: Porcentaje de hidrólisis obtenido.....	101
Tabla 5.13: Matriz de pre-mezclas.....	102
Tabla 5.14: Componentes puros.....	102
Tabla 5.15: Variables de proceso.....	102
Tabla 5.16: Matriz de variables de proceso y mezclas.....	103
Tabla 5.17: Formulación del experimento 1A.....	104

Tabla 5.18: Formulación del experimento 4B.....	104
Tabla 5.19: Formulación del experimento 8C.....	104
Tabla 5.20: DART	107
Tabla 5.21: Funciones de utilidad	108
Tabla 5.22: Regresión para las mezclas	109
Tabla 5.23: Análisis de variables para fu	110
Tabla 5.24: Matriz de optimización	111
Tabla 5.25: Fórmula final del helado	112
Gráfico 1.1: Bomba de desplazamiento positivo	13
Gráfico 1.2: Bomba de émbolo-buzo.....	14
Gráfico 1.3: Alimentador de polvos	14
Gráfico 1.4: Tanque mezclador.....	15
Gráfico 1.5: Homogeneizador	16
Gráfico 1.6: Pasteurizador	17
Gráfico 1.7: Mantecedora horizontal	17
Gráfico 1.8: Mantecedora vertical	18
Gráfico 2.1: Mecanismo de acción de la β -galactosidasa	27
Gráfico 2.2: Modelo de la llave y la cerradura	28
Gráfico 2.3: Modelo de ajuste inducido	28
Gráfico 2.4: Efecto del pH en la actividad enzimática.	31
Gráfico 3.1: Hidrólisis de la lactosa con β -galactosidasa	38
Gráfico 3.2: Reacción de Fehling.....	41
Gráfico 3.3: Crioscopio. “CryoStar Funke-Gerber“	44
Gráfico 4.1: Factores, experimentos y respuesta experimental.....	49
Gráfico 4.2: Ciclo de resolución de un diseño experimental.....	50
Gráfico 4.3: Número de experimentos para n niveles y k factores	52
Gráfico 4.4: Experimentos para un diseño factorial a dos niveles y k factores	55
Gráfico 4.5: Diseño factorial completo a 2 niveles y 3 factores	56
Gráfico 4.6: Normal Probability Plots	63
Gráfico 4.7: Esquema de un diseño central compuesto a 2 niveles y 2 variables....	65
Gráfico 4.8: Modelo de superficie de respuesta cuadrático.....	66
Gráfico 4.9: Dibujo del promedio.....	70
Gráfico 4.10: Región del simplex de tres componentes.	71

Gráfico 4.11: Coordenadas papel gráfico triangular	71
Gráfico 4.12: Tetraedro de cuatro componentes	72
Gráfico 4.13: Superficie del sabor del punch de frutas	73
Gráfico 4.14: Contorno de la superficie del sabor constante del punch de fruta.....	74
Gráfico 4.15: Algunos arreglos (3,m) y (4,m) simplex–lattice, m=2 y m=3.....	77
Gráfico 4.16: Nomenclatura de las respuestas en los puntos.....	81
Gráfico 4.17: Superficie del plano	83
Gráfico 4.18: Representación gráfica de dos diseños mixtos	84
Gráfico 4.19: Funciones de utilidad.....	92
Gráfico 5.1: Half Normal-Plot de los coeficientes	98
Gráfico 5.2: Superficie de respuesta	100
Gráfico 5.3: Gráfico de residuos	110
Gráfico 5.4: Mezcla de componentes.....	111

ÍNDICE DE ANEXOS

Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 706.....	123
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 9:2003.....	128

Lazo Bustamante Jessica Paola.

Verdugo Tenesaca Priscila Rosario.

Trabajo de Graduación.

Ing. Cristian Rojas.

Noviembre 2010

**“ESTUDIO PARA OPTIMIZAR LA CALIDAD TECNOLÓGICA Y SENSORIAL DEL
HELADO TIPO MANTECADO CON HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA MEDIANTE
DISEÑO EXPERIMENTAL”**

INTRODUCCIÓN

En la actualidad con la mejora y la optimización de los procesos de la industria alimentaria, las empresas se ven en la necesidad de impulsar la investigación, desarrollo y aplicación de nuevos métodos para mejorar sus productos y obtener resultados óptimos.

La empresa cuencana “Dulce Compañía Cía. Ltda.”, al observar las necesidades actuales en el campo de los alimentos, decidió mejorar las características sensoriales y tecnológicas del helado que actualmente comercializa, es por ello que una vez realizada una prueba sensorial del helado actual, se pudo detectar algunos defectos importantes en la estructura del helado, que permitieron establecer las variables necesarias para el estudio y que tienen importancia relevante en la textura final del helado.

Este proyecto de tesis está dirigido a optimizar una mezcla de componentes para el helado tipo mantecado, mediante la aplicación de diseño experimental y diseño de mezclas con variables de proceso, para encontrar una fórmula óptima y cumpla con las características deseadas por la empresa.

El estudio comprende dos etapas: la primera, una hidrólisis sobre la lactosa de la leche, en la que se considera tres variables: la cantidad de enzima, tiempo y temperatura a la cual se realizara la incubación. La segunda etapa, la optimización del proceso y producto, que consiste en el estudio de la mezcla de componentes y

el control de variables del proceso como tiempo de maduración y temperatura de batido.

Cada experimento desarrollado en la segunda etapa del estudio será evaluado por un panel de catadores semi-entrenados, esto permitirá evaluar la calidad sensorial y tecnológica del producto y determinar que experimento tiene mayor aceptación, y así establecer cuál es la mezcla de componentes y las condiciones de variables de proceso que dan las mejores características finales al producto.

El proyecto desarrollado constituirá, además una alternativa para establecer una formulación óptima para este tipo de producto a nivel industrial.

CAPITULO I: EL HELADO

1.1. Definición

Según la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 706:2005 [1], el helado es un producto alimenticio, higienizado, edulcorado, obtenido a partir de una emulsión de grasas y proteínas, con adición de otros ingredientes y aditivos permitidos en los códigos normativos vigentes, o sin ellos, o bien a partir de una mezcla de agua, azúcares y otros ingredientes y aditivos permitidos en los códigos normativos vigentes, sometidos a congelamiento con batido o sin él, en condiciones tales que garanticen la conservación del producto en estado congelado o parcialmente congelado durante su almacenamiento y transporte.

1.2. Clasificación de los helados

De acuerdo con su composición e ingredientes básicos los helados se clasifican [1] en:

a. Helado de crema de leche

Helado preparado a base de leche y grasa de ésta, su única fuente de grasa y proteína es la láctea.

b. Helado de leche

Helado preparado a base de leche y cuya única fuente de grasa y proteína es la láctea.

c. Helado de leche con grasa vegetal

Helado cuyas proteínas provienen en forma exclusiva de la leche o sus derivados y parte de su grasa puede ser de origen vegetal.

d. Helado de yogur

Helado en donde todos o parte de los ingredientes lácteos son inoculados y fermentados con un cultivo característico de microorganismos productores de ácido láctico (*Lacto Bacillus Bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*) y probióticos, los cuales deben ser abundantes y viables en el producto final.

e. Helado de yogur con grasa vegetal

Helado de yogurt, cuyas proteínas provienen en forma exclusiva de la leche o sus derivados y parte de su grasa puede ser de origen vegetal.

f. Helado de grasa vegetal

Helado cuya única fuente de proteína es la láctea y la fuente de grasa es de origen vegetal o aceites comestibles vegetales.

g. Helado no lácteo

Helado cuya proteína y grasa no provienen de la leche o sus derivados.

h. Helado de sorbete o Servet

Helado preparado con agua potable, con o sin leches o productos lácteos, frutas, productos a base de frutas u otras materias primas alimenticias; tiene un bajo contenido de grasa y proteínas, las cuales pueden ser total o parcialmente de origen no lácteo.

i. Helado de fruta

Producto fabricado con agua potable o leche, adicionado con frutas o productos a base de frutas, en una cantidad mínima del 10% (m/m) de fruta natural, a excepción del limón cuya cantidad mínima es del 5% (m/m). El helado de fruta se puede reforzar con colorantes y saborizantes permitidos.

j. Helado de agua o nieve

Helado preparado con agua potable, azúcar y otros aditivos permitidos. No contienen grasa, ni proteína, excepto las provenientes de los ingredientes adicionales y puede contener frutas o productos a base de frutas.

k. Helado de bajo contenido calórico

Helado que presenta una reducción en el contenido calórico, con respecto al producto normal correspondiente [1].

1.3. Componentes básicos del helado

Los componentes o ingredientes básicos de los helados son [2]:

1.3.1. Leche y productos lácteos

La leche y los productos lácteos como la leche en polvo; constituyen el principal grupo de componentes de los helados. La grasa de la leche es el vehículo más importante de aroma e influye decisivamente sobre el sabor y la textura, ya que un alto contenido de grasa provoca la formación de cristales de hielo más pequeño. La manteca es una buena fuente de grasa láctea para helados. En la elaboración de helados también se puede usar suero lácteo en polvo, pudiéndose sustituir en 20% a 25% de los sólidos no grasos sin alterar la calidad de los helados.

1.3.2. Grasas

Las grasas desempeñan importantes funciones como ingredientes en la elaboración de los helados: aportan cremosidad y cuerpo al helado, confieren una textura más suave y untuosa, proporcionan el sabor característico y ayudan a la incorporación de aire [3]. Las grasas se oxidan muy fácilmente en presencia de oxígeno, en este proceso se forman ácidos grasos que son fuertemente olorosos y volátiles, lo cual da lugar al enranciamiento, fenómeno que puede evitarse fácilmente conservando los helados a bajas temperaturas y en atmósfera libre de oxígeno [4]. En muchos países está permitida la utilización de grasas vegetales en la fabricación de helados. Son óptimas las grasas con un punto de fusión comprendido entre 28 y 35 °C. Se pueden utilizar grasas de origen vegetal o animal [2].

1.3.3. Proteínas vegetales

En cuanto a las proteínas vegetales se utilizan las proteínas de soya por su bajo costo, sin embargo, no es deseable por su sabor ligeramente amargo. Las proteínas de soya se utilizan en sustitución de la leche en polvo [4].

1.3.4. Aire

El aire es un ingrediente necesario del helado, no pesa, pero incorporado al helado, consigue que éste sea más ligero, menos frío, más cremoso y más dúctil. El aumento de volumen de una mezcla de helado, determinado por el aire incorporado, es lo que se conoce como overrum [3].

El overrum, es por lo tanto, el índice de aireación o la cantidad de aire agregado a la mezcla en porcentaje sobre la misma en volumen. La fórmula utilizada para calcular el índice de aireación es la siguiente [4]:

$$\text{Índice de aireación} = \frac{\text{Volumen del helado} - \text{Volumen de la mezcla}}{\text{Volumen de la mezcla}} * 100$$

Fuente: MADRID, Vicente. 1996. Curso de industrias lácteas. Primera edición. Madrid. Pag.294

1.3.5. Agua

El agua es un componente importante en la elaboración de helados, pues es el principal componente de los sorbetes. El agua que se utiliza debe ser incolora, inodora, insípida y debe ser potable. Puede proceder de la leche si se usa leche líquida, cuando se trabaja con leche en polvo el agua es el medio de solubilidad y reconstitución [4].

1.3.6. Hidratos de carbono

Los hidratos de carbono o también conocidos como carbohidratos, son compuestos con estructura de polihidroxialdehído o de polihidroxiacetona; son la fuente más abundante y barata de alimentos de la naturaleza y por lo tanto los más consumidos por los seres humanos [5].

Constituyen una fuente importante de energía y son importantes en la elaboración de los helados, ya que dan el típico sabor dulce de los helados, muy apreciado por los consumidores; aumentan el contenido de sólidos, bajando el punto de congelación, permitiendo un mayor tiempo de almacenaje y distribución [3].

La sacarosa es el azúcar más importante en la fabricación de helados. El empleo del jarabe de glucosa es beneficioso desde el punto de vista tecnológico, ya que favorece el batido e impide la cristalización de la superficie del producto [6].

1.3.6.1. Funciones de los azúcares en heladería

Los azúcares juegan un papel fundamental en la elaboración de los helados, dado que su adición a la mezcla aporta una serie de condicionantes al resultado final. Así se tiene:

a. Determina el dulzor.

Lo que se conoce por POD o poder edulcorante [3]. Este punto de dulzor, está determinado por el sabor del helado, el gusto de los clientes y la maduración de las propias frutas. No existe un punto de dulzor uniforme, se debe equilibrar en cada fórmula, en cada circunstancia.

b. Interviene en la temperatura de congelación

Lo que se conoce por PAC o poder anticongelante [3]. Mediante el empleo del azúcar se puede obtener una textura más o menos dura según la temperatura de conservación a la que se va a someter al helado. Como se conoce, los azúcares son anticongelantes al igual que el alcohol, pero una presencia mayor o menor de azúcar en la mezcla provocará condiciones más favorables a la formación de hielo,

además es importante conocer también que no todos los azúcares poseen el mismo poder anticongelante. Si se toma como parámetro central la sacarosa; se puede decir que el PAC de la dextrosa es 1,8 veces superior. Esto significa que una solución dextrosa en agua al 10% se congelará a una temperatura 1,8 veces inferior que una solución de sacarosa en agua a idéntica concentración.

Un azúcar importante es la lactosa, carbohidrato contenido en los lácteos, este no aporta prácticamente dulzura pero su PAC es igual al de la sacarosa y debe ser considerado para el cálculo del poder anticongelante de una formulación [3]. El PAC de una formula se encuentra entre un rango de 26 y 29, considerado como aceptable.

El poder anticongelante es un parámetro fundamental que analizar para obtener una textura cremosa en el helado y puede ser definido como el porcentaje de azúcar equivalente, presente en una fórmula de helados en cualquier otra forma de azúcares o alcohol [3].

En el siguiente cuadro se puede observar el POD y el PAC de algunos azúcares.

Tabla 1.1: Poder anticongelante de algunos azúcares

Azúcar	POD	PAC
Sacarosa	1.00	1.00
Dextrosa	0.75	1.80
Lactosa	0.16	1.00
Miel	1.20	1.90

Fuente: ZACARÍA Eduardo. 2007. Asociación Argentina de Ingenieros en la Industria Alimentaria. [en línea]. Disponible en web: <http://aaiia.ar.tripod.com/aaiia>

c. Regulan la textura

Una buena formulación y un buen control del nivel de anti-congelación permiten tener un helado cremoso y estable en unas condiciones determinadas, por lo que es un factor primordial a la hora de obtener un resultado satisfactorio, es decir, un helado aireado y libre de cristales de hielo.

d. Evita la formación de cristales

Los azúcares son esenciales para obtener un equilibrio entre dulzor y el poder anticongelante en el helado, por lo que una correcta formulación evita la formación de cristales, causado por someter a condiciones de frío excesivo a un helado en relación al poder anticongelante por el que ha sido formulado. Se debe conocer que poder anticongelante tiene una fórmula para saber cuál es la temperatura a la cual tiene que ser conservado [3]. Se debe calcular por separado la cantidad de cada tipo de azúcar como multiplicarlo por su PAC y sumar los resultados de todos ellos, por ejemplo:

Tabla 1.2: Crema blanca

azúcar	cantidad	PAC	total PAC
sacarosa	140g	1	140
dextrosa	20g	1,9	38
azúcar invertido	20g	1,9	38
lactosa	50g	1	50
TOTAL PAC			266

Fuente: CORVITTO, Angelo. 2004. Los secretos del helado [en línea]. Disponible en web:

<http://librosdigitalesfree.blogspot.com/search?q=los+secretos+del+helado>. Pag.75

El PAC del ejemplo citado es 266 puntos, con este valor se observa en la tabla 1.3 que la temperatura a la cual debe almacenarse la crema blanca es -11°C .

Tabla 1.3: Relación entre la temperatura de almacenamiento y el poder anticongelante

Temperatura de almacenamiento	Poder anticongelante (PAC)
-10°C	241 a 260 puntos
-11°C	261 a 280 puntos
-12°C	281 a 300 puntos
-13°C	301 a 320 puntos
-14°C	321 a 340 puntos
-15°C	341 a 360 puntos
-16°C	361 a 380 puntos
-17°C	381 a 400 puntos
-18°C	401 a 420 puntos

Fuente: CORVITTO, Angelo. 2004. Los secretos del helado [en línea]. Disponible en web:

<http://librosdigitalesfree.blogspot.com/search?q=los+secretos+del+helado>. Pag.76

1.3.7. Estabilizantes y emulsionantes

Los estabilizantes [4] son aquellas sustancias que impiden el cambio de forma o naturaleza química de los productos alimenticios a los que se incorporan, inhiben las reacciones y mantienen el equilibrio químico de los mismos, su función primordial es la de mejorar la suavidad de la consistencia, retardando la formación de cristales de hielo de tamaño inconveniente, dan uniformidad y resistencia a la descongelación por combinarse con el agua y formar un gel. Los emulsionantes por su parte forman un complejo con la grasa y la proteína, evitando que durante el enfriamiento y batido del helado la grasa se separen, tienen la propiedad de mantener una dispersión uniforme entre dos o más fases no miscibles entre sí, es decir concentrarse entre la interface grasa-agua, logrando unir ambas fases que de otro modo se separan, consiguiendo de este modo una emulsión estable.

Algunos de los ingredientes de los helados tienen un efecto emulgente, es el caso de la yema de huevo, que mejora las cualidades de batido y facilita la congelación. También las proteínas de la leche tienen un efecto emulgente. Hay varias causas que pueden provocar la separación de las fases de los helados entre las cuales se tiene:

- Agitación inadecuada
- Acción microbiana
- Conservación a temperatura inadecuada

Durante el almacenamiento pueden aparecer cristales de hielo como consecuencia de variaciones significativas de temperatura, por debajo o por arriba del punto de fusión. Para evitar este defecto pueden utilizarse estabilizantes como la gelatina, agar, gomas, etc. En el caso de la gelatina y de las pectinas, estas actúan como espesantes y gelificantes por su propiedad de absorber gran cantidad de agua del medio [4].

La lecitina es un estabilizante natural contenida en la yema del huevo. La mayoría de los helados no llevan huevos. No obstante existe lecitina que se extrae de la soja. La dosis normalmente no debe exceder el 0,5%. Los alginatos extraídos de algas marinas son grandes moléculas que le confieren al helado una alta viscosidad y son resistentes a los procesos de pasteurización. El agar es otro estabilizante extraído de algas que tiene la propiedad de absorber grandes cantidades de agua,

se recomienda combinarlo con gelatinas o carragenatos ya que si se usa solo produce una estructura quebradiza al helado [4].

1.3.8. Frutas

La fruta y sus productos dan a los helados aroma y color; por añadidura. Sirven mejor las frutas de aroma intenso, claramente perceptible inclusive a bajas temperaturas.

Las frutas pueden ser utilizadas bajo los siguientes estados: Fruta fresca, fruta desecada, fruta deshidratada, fruta congelada, pulpa de fruta y zumos concentrados de frutas. También se utilizan frutos secos como las nueces [2].

1.4. Equilibrio de la mezcla de helado

El equilibrio de la mezcla de helado [3], se realiza fundamentalmente para lograr que todas las mezclas posean el mismo poder anticongelante y la misma incorporación de aire. No existe un único equilibrio para todos los helados, es necesario tener en cuenta las diferencias de cada tipo y de cada familia, al igual que todos factores externos e internos que intervienen de forma decisiva en la elaboración del producto, tales como ubicación geográfica, factor estacional. Se tiene que equilibrar de manera distinta todos los helados que pertenecen a familias distintas, pero con el objetivo común de que todos presenten la misma resistencia al frío.

Si se consigue el equilibrio los helados, éstos tendrán el mismo peso, igual estructura, textura y un idéntico comportamiento frente a la misma temperatura.

Existen tres principios de equilibrios básicos, que se deben considerar:

1.4.1. Agua-sólidos

El primer equilibrio de la mezcla consiste en lograr una perfecta unión entre los elementos sólidos y el agua. No puede quedar ni una sola gota de agua libre, pero tampoco puede haber un solo gramo de extracto seco en relación con el agua. Si no existe agua ligada dentro de la mezcla, al descender la temperatura a 0°C, esta agua libre se congelaría y daría lugar a la aparición de cristales de hielo que

alterarían la estructura del helado; y un exceso de materia sólida sin relación con el agua daría como resultado un helado seco y de textura arenosa.

1.4.2. Sólidos entre sí

Se deben equilibrar todos los sólidos del helado, tales como azúcar, leche en polvo, estabilizantes, etc. Con este equilibrio se lograra que la mezcla ligue toda el agua libre y además se incorpore todo el aire necesario.

1.4.3. Temperatura de servicio

Es la temperatura de almacenaje del helado que determina su textura final. La temperatura óptima de servicio o almacenaje es -12°C , temperaturas superiores endurecen la textura del helado [3].

1.5. Tecnología de los helados

1.5.1. Maquinaria y equipos

El tamaño y la cantidad de maquinarias y equipos [2] que se utilizan para la elaboración de helados están directamente relacionados con la producción de la planta y con el tipo de helado a elaborar. En una elaboración común, los componentes son ingresados a un tanque de mezcla, que puede ser calentado mediante una camisa de agua caliente y un agitador con velocidad variable, de modo que permita mezclar los componentes a la temperatura y con la energía adecuada para mejorar la disolución y dispersión de los mismos. En este tanque se agregan los componentes: leche, azúcar, crema, estabilizantes, esencias y colorantes, etc.

A escala industrial la dosificación de los componentes líquidos se realiza por medio de bombas de desplazamiento positivo y velocidad variable. Una vez calibradas en función a la velocidad y tiempo se puede lograr una dosificación muy precisa. En el caso de componentes sólidos el uso de tornillos de transporte cumple una función similar a las bombas para los componentes líquidos, para pequeñas cantidades es necesario el uso de las balanzas calibradas realizándose la incorporación de los componentes en forma manual.

Entre las principales maquinarias y equipos utilizados están:

1.5.1.1. Bombas de desplazamiento positivo

En general las más utilizadas son aquellas provistas de un tornillo helicoidal de acero inoxidable, conectado al motor a través de una rótula. Este tornillo, está encamisado en un estator fabricado con un compuesto de caucho especial, resistente a la corrosión por soluciones de limpieza y productos alimenticios, actúa como sello entre éste y el tornillo. A medida que gira el tornillo, los alabes producen un sello con el estator logrando una succión y estanqueidad absoluta. Además el motor posee un variador electrónico de velocidad lográndose de este modo una perfecta regulación de caudal y dosificación. Este tipo de bombas es recomendable para todo tipo de líquidos y especialmente aquellos de características pastosas, como glucosa, crema, etc [4].



Gráfico 1.1: Bomba de desplazamiento positivo

Fuente: DIRECTINDUSTRY 2010. Bomba de desplazamiento positivo [en línea]. Disponible en web: <http://www.directindustry.es/prod/apv/bomba-de-lobulos-higienica-5697-30167.html>

1.5.1.2. Bombas de émbolo-buzo

El principio de funcionamiento de estas bombas consiste en un émbolo o pistón dentro de una camisa que a través de la apertura y cierre de unas válvulas succiona el producto cuando baja el pistón, llena la camisa y dosifica cuando sube el pistón. La regulación del caudal se efectúa variando la carrera de este pistón y variando

también la velocidad del motor. Estas bombas son construidas totalmente en acero inoxidable resistente a la corrosión por agentes químicos [4].



Gráfico 1.2: Bomba de émbolo-buzo

Fuente: DIRECTINDUSTRY 2010. Bomba de émbolo-buzo. [en línea]. Disponible en web: <http://www.directindustry.es/prod/woma/bomba-de-embolo-a-alta-presion-para-agua-industrial-15514-34822.html>

1.5.1.3. Alimentador de polvos

Estos equipos generalmente constan de una tolva de recepción de los productos en polvo como azúcar, leche en polvo, entre otros. La base está conectada a un tornillo sinfín, insertado en un tubo con el espacio necesario para que gire el tornillo. Al girar este último se produce el desplazamiento del producto a dosificar en el extremo del tubo. Estos equipos también poseen regulación de velocidad por lo que la dosificación puede ser muy precisa [4].



Gráfico 1.3: Alimentador de polvos

Fuente: DIRECTINDUSTRY 2010. Alimentador de polvos [en línea]. Disponible en web: <http://www.directindustry.es/prod/sulzer-metco/sistema-de-dosificacion-de-polvo-23581-3Dalimentador%2Bde%2Bpolvos%26um%3D1%26hl%3Des%26tbs%3Disch:1>

1.5.1.4. Tanque mezclador

Los tanques mezcladores o conocidos también como tanques agitadores, son equipos donde se realiza una mezcla de componentes. Son generalmente de forma cilíndrica y la velocidad que alcanzan estos equipos depende de lo que se desea mezclar. Generalmente el equipo consiste en un recipiente cilíndrico ya sea cerrado o abierto, y un agitador mecánico, montado en un eje y accionado por un motor eléctrico. El fondo del tanque suele ser redondeado, con el fin de eliminar los bordes rectos que dificulten el correcto mezclado de los componentes. Sobre un eje suspendido desde la parte superior, va montado un agitador, el cual tiene como finalidad mezclar los componentes de modo adecuado. El agitador crea un cierto tipo de flujo dentro del sistema, dando lugar a que la mezcla circule por todo el recipiente y vuelva de vez en cuando al agitador [4].



Gráfico 1.4: Tanque mezclador

Fuente: MODERNPACK 2010. Tanque mezclador [en línea]. Disponible en web:

<http://spanish.alibaba.com/product-gs/mixer-tank-220120623.html>

1.5.1.5. Homogenizador

Este equipo en realidad consiste básicamente en una bomba de accionamiento positivo. Esta bomba obliga a la mezcla a pasar a través de una válvula de homogeneización. Esta válvula de apertura regulable y de diseño especial tiene un asiento fijo y una parte móvil. El espacio entre ambos es muy pequeño. En este punto se realiza el paso de la mezcla por una ranura estrecha a alta velocidad, sometiendo a los glóbulos de grasa a enormes fuerzas de rozamiento que los

deforman y rompen. La aceleración al pasar por la ranura trae aparejado una fuerte caída de presión, por lo cual los glóbulos grasos literalmente explotan. Al chocar estos glóbulos contra las paredes de la válvula de homogeneización terminan por dividirlos aun más [4].



Gráfico 1.5: Homogenizador

Fuente: PRO-ANDEX ING.LTDA. 2010. Homogenizador. [en línea]. Disponible en web: http://maquinariayequipos.cl/?Remate_de_Equipos

1.5.1.6. Pasteurizador

El pasteurizador es un equipo diseñado para el tratamiento térmico de leche u otros productos alimentarios que permite eliminar los microorganismos patógenos. Su funcionamiento es el siguiente: el producto llega a un tanque de balance donde una bomba lo envía al pasteurizador de placas donde se precalienta al pasar por la sección de recuperación del intercambiador, recuperando el calor del producto ya pasteurizado que está saliendo del retenedor. En la sección de calentamiento recircula agua caliente que eleva la temperatura del producto hasta la temperatura de pasteurización y posteriormente pasa al retenedor donde se mantiene esta temperatura durante 15 segundos o más, dependiendo del producto a pasteurizar, para asegurar una correcta pasteurización regresa a la sección de recuperación, donde cede ese calor al producto que entra. Finalmente, después de la etapa de recuperación, el producto pasa por una etapa de enfriamiento para bajar la temperatura del producto hasta 4°C. El equipo está compuesto por un tanque de balance, una bomba de alimentación centrífuga, un intercambiador de placas, un retenedor, un circuito de agua caliente y una válvula de desvío [4].



Gráfico 1.6: Pasteurizador

Fuente: FRIGOMAT 2010. Pasteurizador [en línea]. Disponible en web:

http://www.frigomat.com/index.php?p=pastorizzatori-peb-lcd-60&main_exp=160&sub_exp=164

1.5.1.7. Batidora de helado

Conocidas también como mantecadoras o freezers, son máquinas que someten a batido y congelación la mezcla, durante un tiempo determinado, para obtener finalmente el helado ya elaborado. Existen varios tipos de batidoras de helados o freezers [4]:



Gráfico 1.7: Mantecadora horizontal

Fuente: FRIGOMAT 2010. Mantecadora Horizontal [en línea]. Disponible en web:

http://www.frigomat.com/index.php?p=mantecatore-verticale-g60&main_exp=167&sub_exp=150



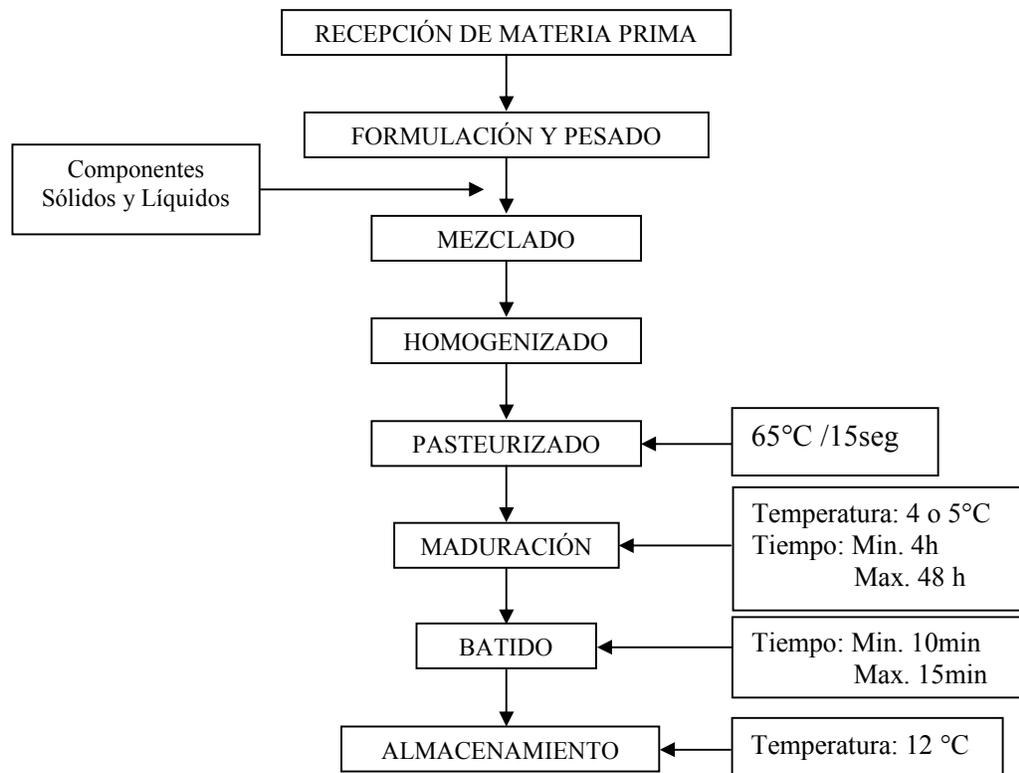
Gráfico 1.8: Mantecedora vertical

Fuente: FRIGOMAT 2010. Mantecedora vertical [en línea]. Disponible en web:

http://www.frigomat.com/index.php?p=mantecatore-verticale-g60&main_exp=167&sub_exp=150

- a. **Verticales:** Son las que llevan el eje del agitador y la cubeta en posición vertical, son las más económicas del mercado.
- b. **Horizontales:** En estas máquinas su estructura está dispuesta de forma horizontal. Son más caras, pero proporcionan un volumen mayor al helado, debido a la disposición del agitador y de la cubeta.
- c. **Freezers discontinuos:** En el depósito del congelador se agrega la mezcla y se pone en marcha la máquina que está provista de un equipo de frío para bajar la temperatura de la mezcla desde 5°C a -8/-10°C. Al mismo tiempo se agita la mezcla mediante un agitador interior. Transcurrido el tiempo programado, se puede abrir la tapa del frente del cilindro congelador y descargar el helado.
- d. **Freezers continuos:** En estas máquinas por un extremo ingresa la mezcla y por otro sale el helado terminado. El ingreso es a 5°C y sale a -6/-10°C, dependiendo del tipo de helado. La capacidad horaria, además del diseño propiamente dicho del equipo depende del tipo de helado y otras condiciones como: temperatura de entrada de la mezcla, temperatura de salida, cantidad de aire, etc. [4].

1.5.2. Diagrama de flujo



1.5.3. Proceso productivo

Las fases involucradas en el proceso productivo o de elaboración de helados varía de acuerdo a la maquina utilizada o el tipo de helado elaborado, sin embargo existe un flujo general que se adapta a los diferentes procedimientos, los cuales comprenden básicamente:

1. Recepción de materia prima

Esta etapa comprende el recibimiento de la materia prima necesaria para la elaboración de los helados.

2. Formulación y pesado de los ingredientes

En esta etapa se hacen los cálculos respectivos de los ingredientes de acuerdo a la cantidad de helados que se quiere obtener, enseguida se pesan cada uno de ellos.

3. Mezclado de los ingredientes

Consiste en juntar todos los ingredientes líquidos en un tanque mezclador, y empezar una agitación continua, luego agregar los ingredientes secos. Los colorantes, frutas y saborizantes, no serán añadidos en esta fase, provocarán el corte de la mezcla. Dichos productos serán añadidos durante la etapa del batido, en frío o en congelación.

4. Homogenización

La mezcla se someterá al proceso de homogenizado. La homogenización descompone los glóbulos grasos en partículas pequeñas uniformes. Al ocurrir estos los glóbulos de grasa no se separan para ascender a la superficie, se reduce al mínimo la agitación de la grasa en la mezcla y la aireación es más fácil. El homogenizado produce un helado con más cuerpo y textura más suave que el helado producido sin homogeniza [4].

5. Pasteurizado

El objetivo de la pasteurización de la mezcla es la destrucción de las bacterias patógenas, que tienen la capacidad de transmitir diversas enfermedades a los consumidores. El proceso de pasteurización se realiza a una temperatura de 62 a 75°C por un tiempo de 15 segundos. Esta condición además de ser más económica, evita someter a la leche y otros alimentos a condiciones de temperatura tales que disminuyen sensiblemente su calidad nutricional. En la elaboración de helados se aplica esta técnica en forma obligatoria, como modo de garantizar la calidad sanitaria de este alimento. Con este proceso también se logran otros objetivos como [4]:

- Destrucción de ciertos tipos de microorganismos generadores de malos sabores y olores.
- Lograr una completa disolución de todos los ingredientes de la mezcla.

- Mejora el sabor y la conservación
- Estabiliza la calidad de la mezcla.

6. Enfriamiento

El proceso completo de pasteurización incluye el rápido enfriamiento de la mezcla, es decir luego de someterla a la temperatura y tiempo indicado, la temperatura desciende rápidamente hasta los 4 o 5°C, impidiendo de este modo la multiplicación de las células sobrevivientes y para evitar la formación de nata.

7. Maduración de la mezcla

Una vez que la mezcla ha sido homogeneizada y pasteurizada, debe ser madurada a una temperatura de 4 o 5°C durante un tiempo no menor de 4 horas y no mayor de 48 horas. Este tiempo es fundamental para obtener los siguientes beneficios [3].

- Cristalización de la grasa
- Tanto las proteínas como los estabilizantes absorben agua obteniendo una buena consistencia del helado
- La mezcla absorberá mejor el aire que se le incorpora en el proceso de batido
- Mayor resistencia al derretimiento

8. Batido en frío o congelamiento

Una vez madurada la mezcla, se produce al batido o congelado del helado. Durante el batido la mezcla se congela en forma gradual formándose pequeños cristales de hielo, la mezcla se hace más viscosa y el aire es incorporado en forma de pequeñas burbujas. En esta etapa se agregan las frutas, colorantes, saborizantes, entre otros aditivos.

CAPITULO II: ENZIMOLOGÍA

2.1. Definición

Las enzimas [5] son catalizadores biológicos que llevan a cabo reacciones bioquímicas a muy altas velocidades y con un elevado grado de especificidad; en su ausencia la mayoría de las transformaciones químicas requerida para mantener activas las células tardarían mucho tiempo en efectuarse. Todas las enzimas son proteínas y tienen una estructura tridimensional globular, además están formadas generalmente por una sola cadena polipeptídica, y solo logran ser activadas cuando los polímeros desarrollan una conformación que permite establecer su centro activo. En muchos casos están integradas por una parte proteica y otra que no lo es, la primera se conoce como apoenzima y la segunda como holoenzima o cofactor.

El cofactor es un compuesto de peso molecular muy bajo, muy estable al calor y presenta diversos grados de unión con la apoenzima. Los principales cofactores son las vitaminas como la tiamina, niacina, piridoxina, riboflavina y ácido pantoténico); los cationes como el cobre, molibdeno, cinc, magnesio, hierro y calcio; los aniones como los cloruros; y otras sustancias orgánicas.

Debido a su naturaleza química, las enzimas se ven afectadas por los mismos factores que alteran a las proteínas, por esta razón cada una de ellas para actuar en forma óptima requiere de ciertas condiciones adecuadas de temperatura, pH, fuerza iónica, etc.[5].

2.2. Funciones de las enzimas

Además de la catálisis, las enzimas también cumplen otras funciones entre las cuales están:

- **Catálisis:** La mayoría de las reacciones químicas del metabolismo son lentas, las enzimas aceleran las reacciones permitiendo que el metabolismo se efectúe a la velocidad que las células requieren.

- **Dirección:** Las enzimas no permiten la formación de productos secundarios, de esta manera evitan que se pierdan precursores y energía que la célula necesita; esta característica también se conoce como catálisis negativa.
- **Control:** La actividad de las enzimas se puede regular para ajustarla a las necesidades del metabolismo. La velocidad del metabolismo es determinada por las enzimas.
- **Acoplamiento:** Las enzimas son los agentes encargados de acoplar reacciones no permitidas con reacciones espontáneas, permitiendo que se realicen [7].

2.3. Clasificación de las enzimas y nomenclatura

La Comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica, ha desarrollado un método para identificar a cada enzima con cuatro dígitos:

- El primer dígito de la nomenclatura indica a que grupo pertenece. (Oxidoreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas, ligasas).
- El segundo dígito de la nomenclatura corresponde a la subclase de enzima.
- El tercer dígito es una subdivisión y ofrece más información con respecto al sustrato que utiliza la enzima.
- El cuarto dígito indica específicamente la acción de la enzima en cuestión [6].

El nombre de cada enzima va encabezado por las letras EC (*enzyme commission*), seguidas de los cuatro dígitos separados por puntos. Por ejemplo: el código para identificar a la glucoamilasa es EC 3.2.1.3, el de la celulasa es EC 3.2.1.4, de la invertasa es EC 3.2.1.26, el de la lactasa o β -galactosidasa EC 3.2.1.23, etc. [8].

Los seis grupos que incluyen a todas las enzimas son:

2.3.1. Oxidoreductasas

Son las enzimas comprometidas en la oxidación de los sistemas biológicos. Catalizan reacciones de oxidorreducción. El subgrupo de las oxidoreductasas comprende las:

- Deshidrogenasas
- Oxidasas

- Peroxidasas
- Oxigenasas
- Hidroxilasas
- Reductasas

2.3.2. Transferasas

Son enzimas que catalizan la transferencia de varios grupos químicos de un sustrato a otro. La clasificación de las transferasas es la siguiente:

- Grupos monocarbonados
- Grupos aldehído o ceto
- Aciltransferasas
- Glicosiltransferasas
- Alquil- o Ariltransferasas
- Grupos nitrogenados
- Grupos fosfato
- Grupos sulfato
- Grupos selenio

2.3.3. Hidrolasas

Son enzimas que llevan a cabo la ruptura de enlaces químicos con la introducción de una molécula de agua. La clasificación de las hidrolasas es:

- Esterasas como las carboxilesterasas, fosfoesterasas, sulfoesterasas.
- Glucosidasas
- Éter hidrolasas
- Péptido hidrolasas
- Acil anhídrido hidrolasas

2.3.4. Liasas

Son enzimas que rompen los enlaces sin participación de agua. El subgrupo de las liasas comprende las que:

- Actúan sobre enlaces C-C
- Actúan sobre enlaces C-O
- Actúan sobre enlaces C-N
- Actúan sobre enlaces C-S
- Actúan sobre enlaces C-S, C-Cl, C-Br, C-I, C-At
- Actúan sobre enlaces P-O

2.3.5. Isomerasas

Catalizan las isomeraciones de distintos compuestos, es decir transforman a sus sustratos de una forma isomérica a otra. Su subgrupo comprende:

- Rasemasas y Epimerasas
- Cis-Trans-Isomerasas
- Oxidoreductasas Intramolecular
- Transferasas Intramoleculares (mutases)
- Liasas Intramoleculares

2.3.6. Ligasas

Promueven la unión de dos moléculas por mediación de ATP o de un compuesto similar. La clasificación de la ligasas es la siguiente:

- Forman enlaces C-O
- Forman enlaces C-S
- Forman enlaces C-N
- Forman enlaces C-C
- Forman enlaces ésteres fosfóricos
- Actúan sobre enlaces N-metal [9].

2.4. Especificidad de las enzimas

La mayoría de las enzimas tienen la capacidad de catalizar reacciones más o menos específicas; es decir, su intervalo de acción se limita a un determinado tipo de compuesto que debe reunir ciertas características para que pueda ser utilizado como sustrato.

La especificidad de las enzimas es la propiedad que las hace diferentes a varios catalizadores no biológicos y se ha dividido en cuatro grandes grupos:

a. Especificidad estereoquímica

Se refiere a que ciertas enzimas utilizan D o L isómeros como sustrato. La mayoría de los monosacáridos en la naturaleza con D, mientras que los aminoácidos pertenecen a la serie, esta especificidad se entiende si se considera que las enzimas son polímeros integrados por L-aminoácidos y que, consecuentemente tienen una estructura asimétrica.

b. Baja especificidad

Cuando es solo importante la reacción enzimática. Se presentan cuando las enzimas atacan un determinado tipo de enlace químico sin importar la naturaleza del sustrato.

c. Especificidad de grupo

Se presentan cuando las enzimas actúan sobre un sustrato que contiene un determinado enlace y un grupo específico, interesa solo la unión y uno de los componentes de la molécula.

d. Especificidad absoluta

Cuando una enzima cataliza una sola transformación y forma un solo producto. Es la más común y consiste en que la enzima utiliza como sustrato una sola sustancia muy específica [6].

2.5. Sitio activo de las enzimas

Cuando una enzima reacciona con el sustrato, no todos los aminoácidos intervienen en la catálisis de la reacción, ya que en la mayoría de los casos sólo unos pocos son los responsables de esta función, es decir; solo ciertas regiones de la molécula de proteína participan en dicho proceso. Estas regiones se conocen como "Sitio Activo". El sitio activo de una enzima es aquella porción de la proteína que participa directamente en la unión y la transformación del sustrato; está integrado por ciertos

aminoácidos seleccionados, los cuales forman un pequeño ambiente característico dentro de la propia cadena y que llevan a cabo la reacción; generalmente existe sólo uno por molécula de enzima [10].

Por ejemplo en el caso de la β -galactosidasa o lactasa, el sitio activo está conformado por un sulfidrilo y un imidazol; éste cede su par de electrones al oxígeno de enlace glucosídico de lactosa y provoca su ruptura, de acuerdo con el mecanismo que este indica en la figura [6].

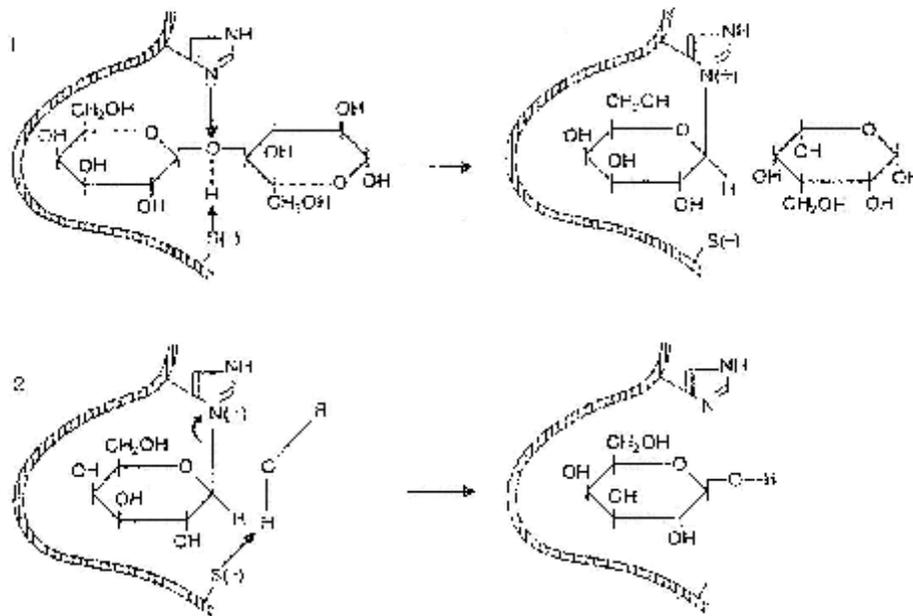


Gráfico 2.1: Mecanismo de acción de la β -galactosidasa

Fuente: BADUI DERGAL, Salvador. 1993. "Química de alimentos". Editores. S.A De C.V. México.

Pág. 285

La porción de la molécula que se encuentra fuera de los sitios activos no participa directamente en la unión con el sustrato ni en la catálisis pero provee de soporte a los sitios activos, además determinan la orientación y espaciado de los sitios activos, afectando de forma indirecta la actividad y la especificidad de la enzima [10].

Existen dos modelos para explicar la unión de la enzima con el sustrato y la catálisis enzimática:

1. Modelo de la llave y la cerradura

Considera que la estructura del sustrato y la del sitio activo son complementarias, de la misma forma que una llave encaja en una cerradura, es decir la enzima es una estructura rígida en la cual se debe ajustar el sustrato.

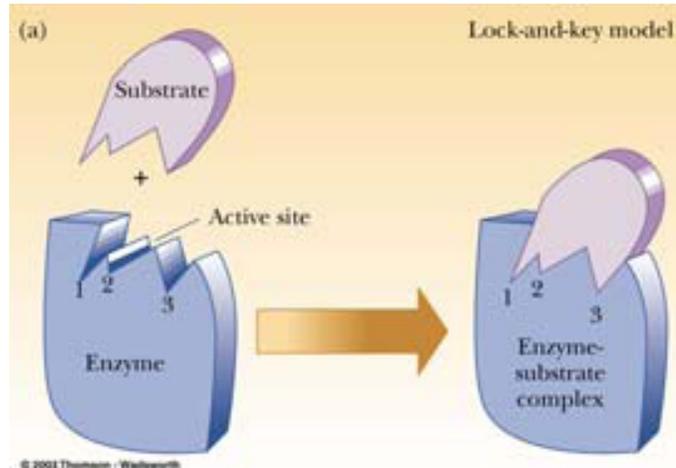


Gráfico 2.2: Modelo de la llave y la cerradura

Fuente: CARRERA, Eliecer. 2010. Modelo de la llave y la cerradura [en línea]. Disponible en web: <http://www.itescam.edu.mx/principal/sylabus/fpdb/recursos/r52038.PDF>

2. Modelo de ajuste inducido

Considera que la enzima es flexible y capaz de cambiar de forma cuando es inducida por la unión del sustrato apropiado, moviendo los grupos hacia posiciones que facilitan la reacción [11].

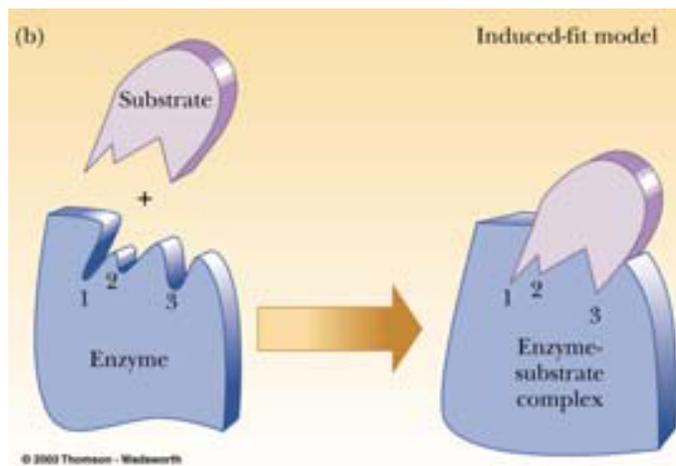


Gráfico 2.3: Modelo de ajuste inducido

Fuente: CARRERA, Eliecer 2010. Modelo de ajuste inducido [en línea]. Disponible en web: <http://www.itescam.edu.mx/principal/sylabus/fpdb/recursos/r52038.PDF>

2.6. Cinética de las reacciones químicas

Las enzimas catalizan reacciones biológicas, y al igual que otros catalizadores, influyen en la velocidad a la cual se alcanza el equilibrio sin afectar el equilibrio global; en estas circunstancias, las transformaciones químicas se llevan a cabo mediante una ruta que requiere menos energía libre de activación

La cinética de las reacciones químicas estudia el mecanismo, la velocidad y los factores que modifican las reacciones catalizadas por enzimas. [5]

2.6.1. Velocidad de reacción

La velocidad de una reacción catalizada por un enzima debe medirse siempre en las condiciones óptimas de pH, temperatura, presencia de cofactores, entre otras; se utilizan siempre concentraciones saturantes de sustrato. En estas condiciones, la velocidad de reacción corresponde a la velocidad máxima (V_{max}). La velocidad puede determinarse midiendo la aparición de los productos o la desaparición de los sustratos [5].

2.6.2. Energía de activación

Se refiere a la energía que se necesita para llevar a cabo una reacción. La presencia de una enzima y la de su sustrato no son suficientes para que la reacción se lleve a cabo, las moléculas que reaccionan deben encontrarse en un estado activado. Las energías de activación requeridas en la presencia de las enzimas son relativamente menores que en ausencia de ellas [10].

2.6.3. Efecto de la temperatura

La velocidad de una reacción se ve afectada considerablemente por las variaciones de temperatura; así, la velocidad de la reacción aumenta con un incremento en la temperatura, pero solo hasta el momento en que la enzima continúa siendo estable y mantiene su capacidad catalítica, cuando aumenta demasiado la temperatura se acelera la inactivación de la enzima como consecuencia de su desnaturalización y la actividad enzimática decrece rápidamente hasta anularse. La temperatura óptima para la mayoría de las reacciones enzimáticas está entre 30°C y 45°C, intervalo en el que las enzimas alcanzan su mayor actividad. La mayoría de enzimas se

inactivan rápidamente a temperaturas superiores a los 55°C. En general, los aumentos de temperatura aceleran las reacciones químicas, por cada 10°C de incremento en la temperatura, la velocidad de reacción se duplica.

Por otra parte, las temperaturas bajas también afectan la actividad enzimática. A estas temperaturas las reacciones se vuelven más lentas pero no se detienen por completo, algunas enzimas actúan bien a temperaturas menores a 10°C.

Una expresión conveniente de la relación entre la velocidad de reacción y la temperatura es el llamado Q_{10} , que corresponde al valor del cociente entre la velocidad de la reacción a dos temperaturas separada por 10°C.

$$Q_{10} = \frac{\text{Velocidad de reacción a } T + 10^{\circ} C}{\text{Velocidad de reacción a } T}$$

Fuente: BADUI DERGAL, Salvador. 1993. "Química de alimentos". Editores. S.A De C.V. México.
Pág. 294

Los valores de Q_{10} para las reacciones catalizadas por enzimas se encuentran entre 2 y 4 [5].

2.6.4. Efecto del pH

La mayoría de las enzimas son muy sensibles a los cambios de pH. Cambios pequeños de pH por encima o por debajo del pH óptimo pueden afectar drásticamente la actividad enzimática. Las enzimas poseen grupos químicos ionizables como carboxilos, amino o tiol, en las cadenas laterales de sus aminoácidos. Según el pH del medio, estos grupos pueden tener carga eléctrica positiva, negativa o neutra. Como la conformación de las proteínas depende, en parte, de sus cargas eléctricas, habrá un pH en el cual la conformación será la más adecuada para la actividad catalítica. El pH óptimo de las enzimas se encuentra en un intervalo de 5 a 8, sin embargo existen algunas excepciones importantes. El valor del pH depende por su parte de los sustratos involucrados y de las condiciones de reacción como tiempo de incubación, temperatura, concentración de sustrato, etc. Un pH muy alto o muy bajo causa una desnaturalización irreversible de la enzima [5].

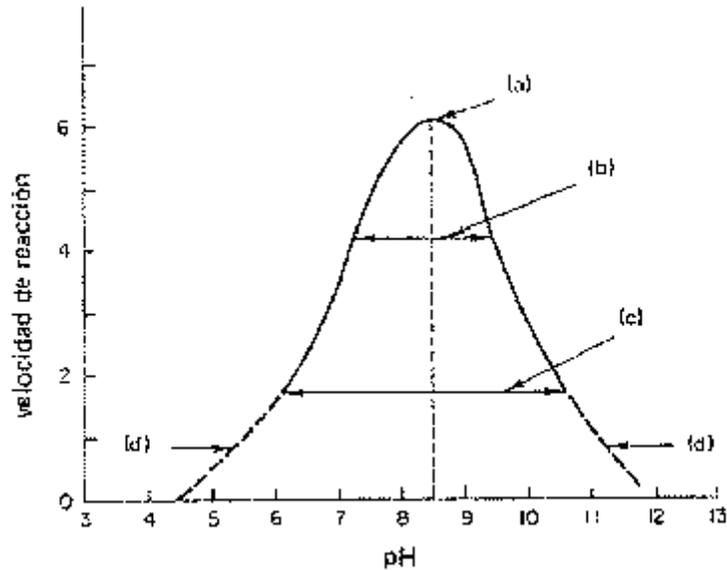


Gráfico 2.4: Efecto del pH en la actividad enzimática.

(a). pH óptimo, (b). intervalo de estabilidad de la enzima, (c) intervalo de inactivación reversible, y (d). inactivación instantánea.

Fuente: BADUI DERGAL, Salvador. 1993. "Química de alimentos". Editores. S.A De C.V. México.

Pág. 293

2.6.5. Concentración de enzima

La velocidad de la reacción enzimática depende de la concentración de enzima, cuando factores como temperatura y pH se encuentran en sus valores óptimos. Cuando el sustrato se encuentra en exceso la velocidad de reacción es directamente proporcional a la concentración de enzima. Al aumentar la concentración de enzima la actividad enzimática aumenta en la misma proporción. [10]

2.6.6. Concentración de sustrato

La velocidad de una reacción enzimática normalmente aumentará con la concentración de sustrato, aunque solo hasta cierto grado, ya que llegado a este punto la velocidad de reacción se verá poco afectada por la concentración de sustrato.

A concentraciones relativamente bajas de sustrato, la velocidad de reacción aumenta en forma proporcional a la concentración de sustrato, obteniéndose una

relación de tipo lineal. Sin embargo, a concentraciones más altas de sustrato, la relación proporcional no se cumple ya que al aumentar la concentración de sustrato, la velocidad no aumenta considerablemente. Es entonces cuando la velocidad de reacción alcanza un valor máximo, en el cual aunque se aumente la concentración de sustrato, la velocidad de la reacción no varía [10].

2.7. Aplicaciones industriales

Debido a que los procesos catalizados por enzimas son cada vez más numerosos, existen gran número de enzimas que son utilizadas en la industria de alimentos.

Las enzimas presentan muchas ventajas frente a otros catalizadores, por ejemplo [5]:

- Son de origen natural
- Son muy específicas en su manera de actuar, por lo que no producen reacciones secundarias indeseables;
- Su velocidad puede ser controlada si se controla el pH, la temperatura y su concentración.
- Son fácilmente inactivadas una vez alcanzado el grado de transformación deseado.

Entre las enzimas utilizadas en la manufactura de alimentos están las siguientes:

2.7.1. Carbohidrasas

Son las más empleadas, se obtienen de fuentes microbianas que pueden ser hongos, levaduras y bacterias.

2.7.1.1. Amilasas

Se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, son las enzimas responsables de la degradación del almidón, y producen los azúcares glucosa y maltosa, los cuales facilitan las reacciones de oscurecimiento no enzimático y la generación de anhídrido carbónico para la elaboración de pan. Las amilasas se pueden dividir en: α amilasas las cuales rompen al azar los enlaces en el interior del sustrato (endoamiladas); β amilasas las cuales hidrolizan ordenadamente unidades de maltosa a partir de los extremos no reductores del sustrato (exoamilasas) [5].

2.7.1.2. Amiloglucosidasa

Conocida también como glucoamilasa, tiene la capacidad de hidrolizar tanto los enlaces $\alpha(1,4)$ como los $\beta(1,6)$ de las glucanas; su acción prolongada puede causar la ruptura total del almidón, El principal producto final de la acción de la glucoamilasa sobre el almidón es glucosa, por lo que se emplea en la fabricación los jarabes de glucosa [12].

2.7.1.3. Lactasa

La lactasa o β -galactosidasa, es una enzima que cataliza la hidrólisis de enlaces galactosídicos β -1,4. Esta enzima se encuentra distribuida en la naturaleza en numerosos microorganismos, en plantas y en tejidos animales. Su aplicación fundamental está en las reacciones de hidrólisis de lactosa en productos y subproductos lácteos [5].

Su aplicación radica en eliminación total de lactosa en leche, de gran interés, para aquellas personas que no pueden metabolizar este disacárido. A escala industrial, su eliminación constituye un importante avance, en la producción y maduración de quesos, así como también en la mejora de las características sensoriales de varios productos lácteos [13].

En los helados puede reemplazarse al menos un 20% de la sacarosa por jarabes de lactosa hidrolizados. La lactasa también puede utilizarse para eliminar la lactosa de concentrados lácteos, en los que este disacárido puede causar la agregación de las caseínas durante el proceso de congelación. En los productos fermentados, los monosacáridos producidos por la acción de la lactasa son una fuente de carbón fácilmente disponible para muchos microorganismos, y por lo tanto el uso de esta enzima puede permitir el empleo de microorganismos deficientes en lactasa para la manufactura de nuevos productos [13].

Su pH óptimo se encuentra en el rango de 4-7. La temperatura óptima de actividad es de 37°C, desnaturalizándose por arriba de ésta si la reacción se efectúa en soluciones amortiguadoras. Sin embargo, la estabilidad se incrementa notablemente, entre 37 y 83 veces, en un rango de 60°C a 65°C cuando trabaja en leche, llegando a presentar una vida media de 146min a 60°C [14].

La lactosa, el azúcar de la leche, tiene menor solubilidad que otros azúcares y tiene tendencia a cristalizar los concentrados de leche y los de suero lácteo; esta cristalización va acompañada de una desestabilización del complejo de caseinato de calcio y conduce a la formación de sedimentos granulosos o arenosos en los productos, como son: leches condensadas, helados de leche y concentrados de suero lácteo, esta cristalización se puede evitar, si se hidroliza por lo menos entre el 20% y el 50% de la lactosa presente mediante la adición de lactasa [14].

Otra aplicación tecnológica de la lactasa es en la elaboración de leches deslactosadas, destinadas a la alimentación infantil y de adultos que presentan una intolerancia a la lactosa por déficit de su lactasa intestinal. En derivados de confitería también se aplica esta enzima, ya que al hidrolizar la lactosa evita que esta se cristalice, además, la mezcla de glucosa y galactosa resultante tiene un sabor más dulce que la propia lactosa [13].

Las mejores fuentes comerciales de lactasa son hongos (*Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*), bacterias (*Bacillus* spp.) y levaduras (*Kluyveromyces fragilis*). [12].

Tabla 2.1: Dosificación de Maxilact L 2000

Dosificación de Maxilact L 2000 (ml/l)	Tiempo de reacción	Temperatura de reacción °C	Grado de hidrólisis %
0.3 - 0.5	10	5	20
0.1 - 0.2	24	5	20
0.5 - 0.9	1	30	20
0.1 - 0.2	4	30	20
*0.2 - 0.4	1	40	20
0.05 - 0.1	4	40	20
1.0 - 1.6	10	5	50
0.5 - 0.7	24	5	50
2.1 - 3.1	1	30	50
0.5 - 0.8	4	30	50
0.9 - 1.4	1	40	50
0.2 - 0.4	4	40	50
3.5 - 5.4	10	5	80
1.5 - 2.2	24	5	80
6.9 - 10.4	1	30	80
1.7 - 2.6	4	30	80
2.9 - 4.4	1	40	80
0.7 - 1.1	4	40	80

Fuente: INTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGÍA INDUSTRIAL. 2006. Dosificación de MaxilactL2000 [en línea]. <http://www.interenzimas.com/Interenzimas> (visitado ene septiembre de 2007).

2.7.1.4. Celulasas

La celulasa es un sistema complejo de enzimas que hidrolizan las uniones β -1,4 de las glucanas, como la celulosa, se usa para mejorar la extracción de aceites esenciales, así como también para ablandar algunas verduras y frutas [5].

2.7.1.5. Invertasa

La invertasa o fructofuranosidasa hidroliza principalmente a la sacarosa, pero también pueden hidrolizar la rafinosa para dar fructosa y melibiosa. El pH óptimo es 4.5, pero se logra un 80% de actividad entre 3.5-4.5. Tienen actividad máxima a una temperatura entre 50-60°C. El efecto de la concentración de sustrato es relevante, ya que la máxima actividad se logra con concentraciones de sacarosa entre el 5-10%. La invertasa es de gran importancia en la industria de alimentos ya que la hidrólisis de la sacarosa forma jarabes más dulces y los monosacáridos formados por la acción de la invertasa son más solubles que la sacarosa, por lo que no se cristalizan en los jarabes concentrados [12].

2.7.1.6. Pectinasa

El término se refiere a un complejo formado por varias enzimas, presentes en diversas proporciones, capaces de actuar sobre las pectinas y sus derivados. El grupo incluye la pectinmetilesterasa, la poligalacturonasa y la pectinliasa. Se usan en la extracción, clarificación y filtración de diversos jugos de frutas y de vinos, se emplean también en la elaboración de purés y concentrados de frutas [12].

2.7.2. Lipasas

Las enzimas lipolíticas constituyen un importante grupo de enzimas asociado con el metabolismo y degradación de grasa. Estas enzimas hidrolizan los triglicéridos dando lugar a mezclas de ácidos grasos libres, monoglicéridos y diglicéridos. Las lipasas son de interés a la industria de alimentos porque si no se controlan pueden dar lugar a rancidez indeseable en los productos lácteos, cárnicos y otros que contengan grasa. En general se usan poco, su mayor aplicación es en la elaboración de diversos productos lácteos [12].

2.7.3. Proteasas

Las proteasas son enzimas que hidrolizan las cadenas polipeptídicas de las proteínas, se caracterizan por tener diferentes grados de intensidad y de selectividad, es decir que se usará la enzima más adecuada de acuerdo con la necesidad de la transformación requerida. Existen de origen vegetal (papaína, bromelina y ficina), animal (renina, pepsina, tripsina y quimotripsina) y microbiológico (hongos y bacterias) [5].

2.7.3.1. Papaína

El término papaína se aplica tanto a las preparaciones enzimáticas crudas obtenidas del látex de papaya como a las distintas fracciones proteicas del mismo [5].

2.7.3.2. Bromelina

Se obtiene del jugo, de la fruta o de los tallos de la piña. Es una glicoproteína del grupo de las cisteín proteasas. Actúa de preferencia sobre los aminoácidos básicos y aromáticos de las proteínas. Su pH óptimo varía con el sustrato, en el rango de 5 a 8. Tiene baja tolerancia térmica. La enzima se utiliza principalmente como ablandadora de carne y para hidrolizar proteínas solubles de la cerveza que pueden precipitar y causar opacidad por el enfriamiento [5].

2.7.3.3. Ficina

Es una cisteín proteasa, se obtiene del látex de las plantas del género Ficus. Presenta hidrólisis preferencial por los aminoácidos aromáticos. El pH óptimo varía con el sustrato y se encuentra en el rango 5-8. La temperatura óptima está alrededor de 60°C, inactivándose completamente a 80° C [12].

2.7.3.4. Renina o Quimosina

Es una proteasa ácida, aislada del estómago de los terneros jóvenes, utilizada para precipitar la caseína sin promover un nivel de proteólisis elevada. En los terneros maduros, la quimosina se reemplaza por pepsina como enzima mayoritaria a nivel estomacal. La pepsina causa un grado superior de proteólisis en la leche en

comparación con la quimosina, con lo cual se forman péptidos cortos con sabor amargo que afectan la calidad final de los quesos. Se emplea en la elaboración de quesos, ya que es la que determina la coagulación de la leche en presencia de sales de calcio, para la formación de la cuajada. La renina actúa sobre la fracción kappa-caseína de la leche con liberación de varios péptidos. Al realizar su acción proteolítica, se destruye el efecto de coloide protector de la micela de caseína, causando su floculación [4] [12].

CAPITULO III: BIOTECNOLOGÍA DE LA HIDRÓLISIS

3.1. Hidrólisis enzimática

Los disacáridos y los polisacáridos deben ser hidrolizados hasta monosacáridos para poder pasar la pared intestinal para llegar al torrente sanguíneo y poder ingresar al interior de las células para su utilización.

La hidrólisis de un enlace glucosídico se lleva a cabo mediante la disociación de una molécula de agua del medio. El hidrógeno del agua se une al oxígeno del extremo de una de las moléculas de azúcar, el OH se une al carbono libre del otro residuo de azúcar.

El resultado de esta reacción, es la liberación de un monosacárido y el resto de la molécula que puede ser un monosacárido si se trataba de un disacárido o bien del polisacárido restante si se trataba de un polisacárido más complejo [15].

3.2. Hidrólisis de la lactosa

La lactosa, disacárido formado por glucosa y galactosa, es prácticamente el único carbohidrato presente en la leche, en la que se encuentra en una concentración de 4.7% a 5.2% en la leche de vaca, 6.5% en la leche humana y alrededor de 4.5% en leches de cabra y oveja.

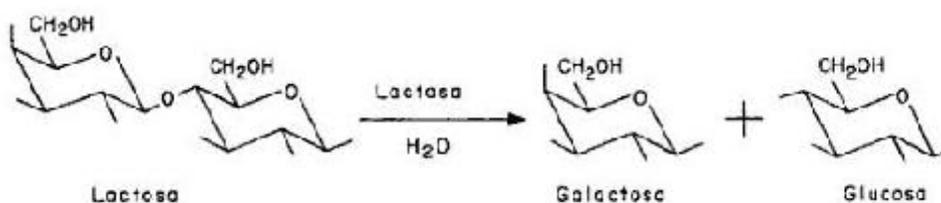


Gráfico 3.1: Hidrólisis de la lactosa con β -galactosidasa

Fuente: LOPEZ, Agustín., GARCÍA, Mariano. 2002. Biotecnología Alimentaria. [en línea].

Disponible en web:

<http://books.google.com.ec/books?id=2ctdvBnTa18C&printsec=frontcover#v=onepage&q&f=false>.

La hidrólisis enzimática de este azúcar es efectuada por la β -galactosidasa o lactasa, la cual mediante la inclusión de una molécula de agua rompe el enlace glucosídico (1-4) que une los dos monosacáridos. Esta enzima es producida en los mamíferos en el intestino delgado principalmente en el yeyuno, en donde se efectúa la hidrólisis y la absorción de los monosacáridos. La actividad de la lactasa se manifiesta por primera vez unos días antes del nacimiento siendo máxima durante la lactancia y disminuyendo en la infancia, para ser mínima en los adultos. Este patrón es válido para todos los mamíferos; sin embargo, en los humanos existen ciertos grupos étnicos, principalmente de origen caucásico, que han conservado la capacidad de hidrólisis aun en la población adulta [15].

Las personas con baja o nula actividad de lactasa presentan trastornos gastrointestinales al ingerir lactosa debido a que si la hidrólisis no se efectúa, la lactosa pasa intacta al intestino grueso donde las bacterias ahí presentes la degradan generando gases y ácidos orgánicos, y producen flatulencia, diarrea, dolores intestinales, etc. La cantidad de lactosa que puede ser ingerida sin ocasionar molestias, así como la severidad de los síntomas depende de cada individuo. A este tipo de intolerancia se le denomina primaria y es irreversible, cuando la intolerancia es debida a otras causas como es el caso de bebés prematuros, personas que acaban de sufrir algún padecimiento gastrointestinal, desnutrición u otras afecciones que involucran las mucosas intestinales, se les denomina secundarias y es por lo general pasajera.

Este hecho originó innumerables estudios tendientes a la hidrólisis de la lactosa por medio de enzimas exógenas, no solo para el consumo de leche por personas sanas pero con mala absorción de la lactosa, sino para la elaboración de dietas especiales para enfermos, ancianos, bebés intolerantes, etc. [14].

La lactosa al ser hidrolizada, la leche adquiere un gusto más dulce debido a la presencia de glucosa libre, uno de los productos de la hidrólisis de la lactosa.

El mismo proceso puede utilizarse con suero de queso, producto de desecho que, si no se utiliza, se transforma en un contaminante para el medio ambiente. La posibilidad de hidrolizar la lactosa con β -galactosidasa inmovilizada, permite obtener un producto que luego puede ser secado para ser usado como edulcorante en la producción de helados, bebidas o productos de panadería y confitería. La ventaja de este producto seco, con respecto al que se obtendría secando suero de

queso, es que no aparecen cristales de lactosa hecho que es importante sobre todo en la fabricación de helados [15].

3.3. Hidrólisis industrial

La hidrólisis en planta se realiza con el fin de producir leche con bajo contenido de lactosa para su venta al público. De los procesos existentes con este propósito solo uno se lleva a cabo utilizando la enzima inmovilizada.

El proceso de hidrólisis con la enzima libre consiste en la adición de una lactasa de levadura a la leche previamente pasteurizada, la leche se deja incubar con la enzima a 4°C a 6°C durante aproximadamente 8 horas o a 35°C durante 2 a 3 horas, pero con una mayor cantidad de enzima. Después de la incubación de la leche puede o no ser pasteurizada nuevamente para detener la reacción enzimática antes de envasar. En el caso de la leche ultrapasteurizada, la enzima se esteriliza mediante filtración y se agrega a la leche estéril inmediatamente antes del envasado aséptico.

La hidrólisis, en este caso, se efectúa en el envase, permitiendo tiempos de hidrólisis mucho más largos y, por lo tanto, el uso de una cantidad considerablemente menor de enzima. Se estima que la hidrólisis puede ser completada en 7 a 10 días a temperatura ambiente. La enzima debe estar libre de cualquier actividad proteolítica ya que de lo contrario provocaría la coagulación de la leche [14].

3.4. Métodos para la determinación de la hidrólisis de la lactosa

Los monosacáridos y la mayoría de los disacáridos poseen poder reductor, que deben al grupo carbonilo que tienen en su molécula. Este carácter reductor puede ponerse de manifiesto por medio de una reacción redox llevada a cabo entre ellos y sulfato de cobre. Las soluciones de esta sal tienen color azul. Tras la reacción con el glúcido reductor se forma óxido de cobre de color rojo. De este modo, el cambio de color indica que se ha producido la citada reacción y que, por lo tanto, el glúcido presente es reductor. Los métodos utilizados para determinar la hidrólisis de la lactosa se basan en el principio reductor [15] y son [32]:

3.4.1. Método de Fehling

Cuando se calienta una solución de un azúcar reductor con un volumen igual de licor de Fehling mezclado, en agua hirviendo, la sal cúprica se reduce a óxido cuproso rojo. La reacción es positiva para la lactosa y la maltosa, así como para los monosacáridos. La sacarosa también produce un precipitado si la solución ha sido previamente hidrolizada a glucosa y fructosa por medio de calentamiento con ácido.

Los azúcares reductores también forman un espejo de plata cuando se calientan con soluciones de plata moniacal. La determinación de los azúcares reductores por titulación con el licor Fehling es un método empírico y, por lo tanto, deben seguirse en forma rigurosa las condiciones experimentales estandarizadas, y los procedimientos para obtener resultados satisfactorios [32].

Reacción de Fehling:

Los monosacáridos son reductores, esto es, reducen las sales de cobre de cúpricas (azul) a cuprosas (rojo).



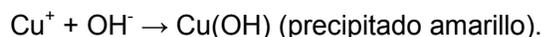
Gráfico 3.2: Reacción de Fehling.

Fuente: EDUCASTUR 2010. Reacción de Fehling [en línea]. Disponible en web: http://web.educastur.princast.es/proyectos/biogeo_ov/2bch/B1_BIOQUIMICA/t13_GLUCIDOS/diapositivas

3.4.2. Método de Benedict

Existen varias reacciones químicas que permiten determinar si se está en presencia de un azúcar reductor o no. La prueba de Benedict es una de ellas y se basa precisamente en la reacción o no de un azúcar con el ion cuprúico. El reactivo de Benedict contiene soluciones de carbonato de sodio, sulfato de cobre, y citrato

de sodio. El carbonato de sodio confiere a la solución un pH alcalino necesario para que la reacción pueda llevarse a cabo. El citrato de sodio mantiene al ion cúprico en solución ya que tiene la propiedad de formar complejos coloreados poco ionizados con algunos de los metales pesados. Con el cobre produce un complejo de color azul. Si se le agrega al reactivo una solución de azúcar reductor y se calienta hasta llevar la mezcla a ebullición, el azúcar en solución alcalina a elevadas temperaturas se convertirá en D-gluconato y su ene-diol, rompiéndose luego en dos fragmentos altamente reductores, los cuales con sus electrones expuestos, reaccionarán con el Cu^{++} . Se obtiene entonces un azúcar oxidado y dos iones Cu^+ . Posteriormente el Cu^+ producido reacciona con los iones OH^- presentes en la solución para formar el hidróxido de cobre:



El hidróxido pierde agua



La aparición de un precipitado amarillo, anaranjado, o rojo ladrillo evidencia la presencia de un azúcar reductor.

El fundamento de esta reacción radica en que en un medio alcalino, el ion cúprico es capaz de reducirse por efecto del grupo Aldehído del azúcar a su forma de ion cuproso. Este nuevo ion se observa como un precipitado rojo ladrillo correspondiente al óxido cuproso [32].

3.4.3. Método de Somogyi

Cuando los azúcares reductores son calentados en una solución alcalina de cobre cúprico, estabilizado con tartratos, el cobre es reducido y precipitado como óxido cuproso. El óxido cuproso formado es proporcional a la cantidad de azúcar reducida presente. EL método de Somogyi utiliza el reactivo de tartrato alcalino de cobre y yodato de potasio para reaccionar en caliente con el azúcar reductor; el exceso de yodato se cuantifica yodométricamente con tiosulfato de sodio después de la adición de yoduro de potasio y ácido sulfúrico diluido. De manera alternativa el cobre no reducido puede determinarse colorimétricamente usando un reactivo de arsenomolibdato [32].

3.4.4. Método de HPLC

De igual manera se puede correlacionar el punto de congelación con el porcentaje de hidrólisis determinado en forma absoluta por un método de referencia, en este caso el HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Precisión), encontrándose un coeficiente de correlación de 0,997. Lo que permite verificar el comportamiento lineal y la precisión del método de crioscopia, utilizado para seguimiento y control de los porcentajes de hidrólisis de lactosa a diferentes tiempos y diferentes concentraciones de enzimas [15].

La Cromatografía Líquida de Alta Precisión (HPLC), también conocida como de alta eficiencia es la técnica más útil y la más usada para la identificación y determinación cuantitativa de los azúcares de los alimentos.

La separación de HPLC de los azúcares de los alimentos se efectúa en lo habitual por medio de una cromatografía de cationes fuertes o, mediante la interacción con varias formas de las partículas de gel de sílice de superficie modificada. El gel de sílice simple puede modificarse *in situ* normalmente en la incorporación de una pequeña cantidad de una diamina o una poliamina en fase móvil. Uno de los grupos amino reacciona con los grupos hidroxilos de la superficie del silicio, mientras que el otro grupo amino donador de electrones interacciona en forma diferencial con diversos azúcares para efectuar la separación cromatográfica [32].

3.4.5. Crioscopia

El fundamento de la crioscopia se basa en la disminución del punto de congelación a medida que aumentan los solutos. La leche presenta un punto de congelamiento menor que el del agua destilada debido a su contenido en minerales y lactosa. Durante la hidrólisis de la lactosa, se forman, glucosa y galactosa, incrementando la relación de solutos en la solución. Esta hidrólisis se ve acompañada por el correspondiente descenso del punto de congelación de la solución [16].

Históricamente los métodos utilizados como referencia han sido el HPLC o enzimáticos/UV, pero los procedimientos requieren tiempo y equipos sofisticados, además de personal entrenados.

La técnica de determinación de descenso crioscópico es rápida y tienen la ventaja que utiliza equipos usualmente encontrados en la industria láctea, evitando inversiones adicionales. Además esta metodología se utiliza no solo para determinar el porcentaje de hidrólisis, sino también para conseguir, variando temperaturas de trabajo y concentraciones enzimáticas diferentes condiciones operativas en planta.

También se utiliza la fluorimetría siguiendo la hidrólisis enzimática del disacárido. Estos métodos tienen características que requieren tiempos largos, equipo sofisticado, reactivos caros y corrosivos, una cantidad considerable de material de vidrio y destrezas analíticas [15].

El equipo que es utilizado para la crioscopia se llama crioscopio, con el cual se mide la temperatura de congelamiento de una sustancia. La temperatura de congelamiento es aquella en la cual una sustancia pasa del estado líquido al estado sólido cuando el líquido se enfría, es un indicador de pureza útil, si se libera calor cuando se presenta la solidificación, demuestra cualquier impureza disuelta presente solamente en el líquido y no en el sólido, las sustancias puras tienen un punto de congelación bien definido pero las mezclas generalmente congelan sobre un rango de temperatura. Para muchas mezclas, la temperatura de congelación es un índice de pureza útil si se determina siguiendo correctamente los métodos [33].



Gráfico 3.3: Crioscopio. “CryoStar Funke-Gerber“

Fuente: LABWAY 2010. Crioscopio [en línea]. Disponible en web:

www.labway.sk/CryoStar_Funke-Gerber

Existen dos tipos de equipos que utilizan este fundamento de las propiedades coligativas de los líquidos para su funcionamiento, los *crioscopos* y los *osmómetros*,

los cuales miden la depresión o abatimiento del punto de congelación, en los cuales un volumen medido de la solución es colocado en el tubo de muestra y es sumergido en un baño de temperatura controlada. Luego un termopar y un vibrador son colocados dentro de la mezcla y la temperatura del baño es bajada hasta que la mezcla es super-enfriada. Entonces se activa el vibrador para inducir la cristalización del agua en la solución de prueba y el calor de fusión liberado eleva la temperatura hasta el punto de congelación [33].

Por medio de un puente de Wheatstone (instrumento eléctrico para medir resistencias), el punto de congelación registrado se convierte en una medida en términos de osmolaridad. El instrumento se calibra utilizando soluciones de referencia de cloruro de sodio que cubran el rango esperado de osmolaridades. Uno de los indicadores más susceptibles a la adición de materiales extraños en la leche es el punto crioscópico, el cual está regulado por las normas nacionales e internacionales, la leche fluida fresca deberá tener un punto crioscópico de -0.53 a -0.57 Horvet o de -0.512 a 0.550°C [30].

3.5. Ventajas de la hidrólisis de la lactosa

Las ventajas de la hidrólisis de la lactosa son [14]:

3.5.1. Incremento en el poder edulcorante

La hidrólisis de la lactosa tiene además ciertas consecuencias funcionales, que pueden ser utilizadas en la elaboración de algunos derivados. Una de ellas es el incremento en el poder edulcorante.

La lactosa es un azúcar poco dulce; sin embargo, al hidrolizarse, la glucosa y la galactosa por separado tienen un efecto edulcorante mayor. En leche hidrolizada, este ligero incremento en el sabor dulce puede ser objetado por algunas personas; sin embargo, se ha encontrado que en general es aceptado e incluso resulta atractivo especialmente en niños y adolescentes.

En otros productos se puede obtener una gran ventaja de este mayor poder edulcorante, tal es el caso de leches con sabor, helados, leches condensadas y azucaradas y todos aquellos productos dulces en los que se utiliza leche como ingrediente, ya que se puede reducir la cantidad de sacarosa agregada. El caso del

yogurt es especialmente interesante, ya que este tiende a ser considerado como un producto dietético, pero se sabe que los yogures dulces y con sabor son los mejor aceptados; por lo tanto si éste es elaborado con leche hidrolizada, se podrá tener un yogurt más dulce sin necesidad de agregar más calorías [14].

3.5.2. Incremento en la solubilidad

La lactosa es un azúcar poco soluble y que tiende a cristalizar en algunos productos que la contienen, dándoles una textura y apariencia arenosas que disminuyen su aceptabilidad. La hidrólisis de ésta en sus respectivos monosacáridos aumenta considerablemente la solubilidad, disminuyendo la posibilidad de cristalización. Estos problemas se presentan en aquellos productos con un gran contenido de sólidos como leches condensadas y azucaradas, helados, donde además la baja temperatura disminuye aún más la solubilidad [14].

3.5.3. Incremento de azúcares fermentables

Dado que la lactosa es un azúcar inaccesible para muchos microorganismos, la generación de glucosa y galactosa a partir de ésta la hace aprovechable para un mayor número de ellos. La masa para panificación con una β -galactosidasa favorece el aumento del volumen de la hogaza, ya que de la lactosa, inaccesible para *S.cerevisiae*, se genera glucosa, el azúcar más fácilmente asimilable por esta levadura. La galactosa no puede ser aprovechada por todas las cepas para *S.cerevisiae*.

Por otro lado, se reportan efectos favorables en la asimilación de la lactosa hidrolizada aún por microorganismos capaces de utilizarla, tal es el caso del yogurt y en la elaboración de quesos como el cheddar, en el cual se reduce el tiempo de fermentación con las bacterias lácticas, así como el tiempo de maduración, favoreciendo el desarrollo de sabores y aromas [14].

3.5.4. Otras ventajas

El aumento de azúcares reductores producidos por la hidrólisis de la lactosa favorece las reacciones de Maillard y caramelización deseables en ciertos productos como pan y leche condensada y azucarada [14].

CAPITULO IV: DISEÑO EXPERIMENTAL

4.1. Introducción

El diseño experimental es una herramienta ampliamente utilizada en la actualidad, y es considerada una pieza clave en la ingeniería de la calidad. Su utilización generalizada comenzó en Japón en la década de los sesenta, aunque se debe resaltar que se trata de una técnica desarrollada por Sir **Ronald Fisher** por el año 1935. Este ingeniero agrónomo desarrolló el diseño experimental aplicándolo al campo de la agricultura y en particular a la mejora de la calidad y productividad de cereales y patatas. Fisher continuó elaborando esta técnica junto a **Frank Yates**, desarrollando el estudio a un factor y los diseños factoriales incipientes a dos y tres niveles. En 1946, **Robin L. Plackett** y **J. P. Burman** comienzan a desarrollar los diseños de screening, que consistían en estudiar muchos factores con poco esfuerzo. El Doctor **Genichi Taguchi** propició una evolución de gran envergadura desde el Japón, en base al desarrollo de métodos propios caracterizados por el empleo de las matrices ortogonales. Después de la segunda guerra mundial, Taguchi fue requerido por la Bell Company para solucionar los problemas que habían surgido en las líneas telefónicas existentes entre las islas de Japón, provocados por el ruido en las comunicaciones [17].

El diseño de experimentos permite optimizar la información generada a cerca de un proceso, en relación a los objetivos planteados. En otras palabras, el diseño experimental es la aplicación de métodos científicos para generar conocimiento a cerca de un sistema o proceso. Esta herramienta se ha ido consolidando en la industria actual como un conjunto de técnicas estadísticas y de ingeniería, que permiten lograr la máxima eficacia de los procesos con el mínimo costo. El diseño de experimentos es especialmente útil para crear calidad desde la fase de diseño del producto y del proceso; pero también permite lograr mejoras sustanciales en procesos ya establecidos [18].

La experimentación científica juega un rol muy importante en el desarrollo de la investigación y del conocimiento científico. Las ciencias parten siempre de problemas que se tienen que resolver y de los cuales siempre se elabora una

expectativa, una hipótesis, un sistema de conceptos o una verdadera teoría. Es por esto que a la luz de estos fundamentos conceptuales, que la observación es tangible, que el experimento es concebido, leído e interpretado. El experimento por si solo no permite entender el mundo o descubrir la realidad, pero si de armonizar y racionalizar las relaciones entre la hipótesis y eventuales hechos, entre teorías y resultados experimentales, y en última instancia, para desarrollar teorías científicas coherentes. Es bajo estas condiciones que un experimento no permite por si solo tener una relevancia científica, ni constituir una fuente absoluta y definitiva de conocimiento; dicho en otras palabras, un experimento adquiere importancia dentro de un contexto, organización y planificación. La realización de medidas experimentales es uno de los elementos más caracterizantes en la actividad de investigación. La experimentación, involucra en verdad todas las áreas de la investigación aplicada e industrial y puede abarcar las situaciones más diversas, por ejemplo: desarrollo de nuevos productos, puesta a punto de métodos o procedimientos, la calibración de un instrumento analítico, la determinación de propiedades moleculares, la optimización de la actividad farmacológica de un fármaco, del rendimiento de una reacción química, de la forma de síntesis de nuevas moléculas, de la calidad reológica de un producto, etc. [19].

4.2. Generalidades del diseño experimental

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

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

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

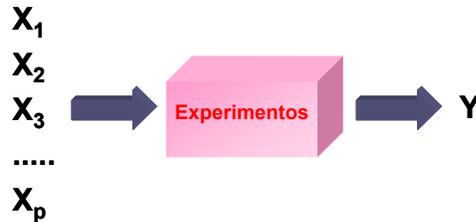


Gráfico 4.1: Factores, experimentos y respuesta experimental

4.3. Objetivos del diseño experimental

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

- Obtener un conocimiento inicial sobre un nuevo sistema en estudio. ¿En qué valores de los factores se puede centrar la investigación?.
- Determinar la influencia de los factores sobre las respuestas observadas. De entre todos los factores que afectan al proceso, ¿cuales influyen más?, ¿cómo interaccionan entre ellos?.
- Optimizar respuestas. ¿Qué valores de los factores proporcionan las respuestas de mayor calidad?.
- Determinar la robustez del sistema. ¿Como afectan a la respuesta variaciones no controladas en el valor de los factores?

4.4. Ventajas del diseño experimental.

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

4.5. Etapas de un diseño experimental

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

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

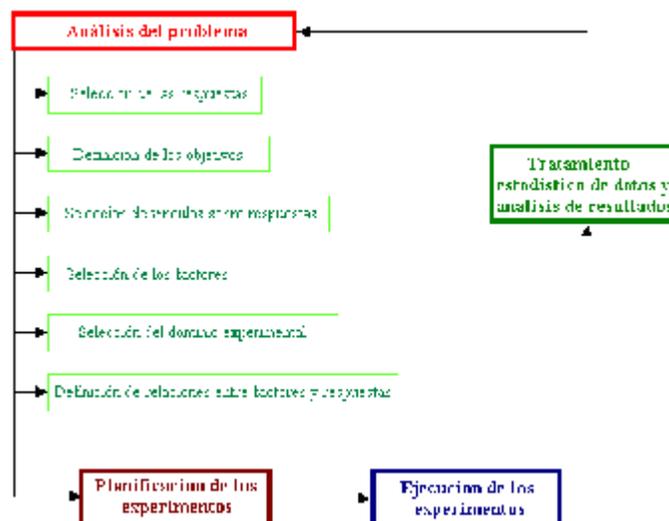


Gráfico 4.2: Ciclo de resolución de un diseño experimental

4.5.1. Análisis del problema

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

1. Definir de la función respuesta.
2. Establecer los objetivos.
3. Definir los vínculos sobre la respuesta.
4. Analizar el sistema estudiado
5. Definir el dominio experimental.
6. Establecer las hipótesis sobre las relaciones entre respuestas y factores.

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

4.5.2. Planificación de los experimentos

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

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

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

Tabla 4.1: Número de experimentos para n niveles y k factores

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

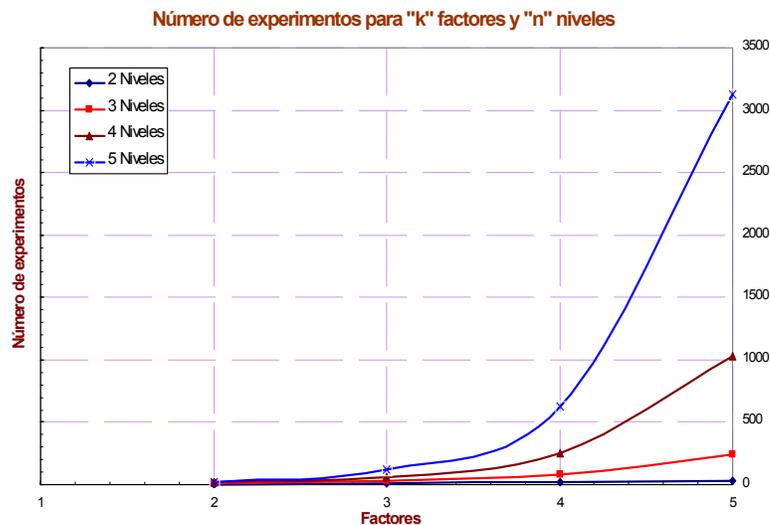


Gráfico 4.3: Número de experimentos para n niveles y k factores

4.5.3. Ejecución de los experimentos

Esta fase consiste en la realización efectiva de los experimentos planificados. En la ejecución de los experimentos es absolutamente necesario atenerse a los

procedimientos estándares, de tal forma de evitar que la variación relevante de la medida experimental dependa también de cómo el experimentador ha procedido al momento de efectuarla. El objetivo de un procedimiento estandarizado es el de reducir el error experimental y obtener la máxima repetibilidad y reproducibilidad; para tal efecto es importante randomizar los experimentos de la lista de planificación.

4.5.4. Tratamiento estadístico de los datos y análisis de resultados

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

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

4.6. Escalado de las variables

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

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

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

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

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

$$X' = 2 \cdot \frac{X - X_{MIN}}{X_{MAX} - X_{MIN}} - 1 \quad (4.1)$$

$$-1 \leq X' \leq +1 \quad (4.2)$$

$$\begin{array}{ll} X_{MAX} = \text{valor máximo de cada variable} & X' = +1 \\ X_{MIN} = \text{Valor mínimo de cada variable} & X' = -1 \end{array}$$

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

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

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

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

Tabla 4.2: Matriz del diseño a dos niveles para 1, 2, 3 y 4 variables

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

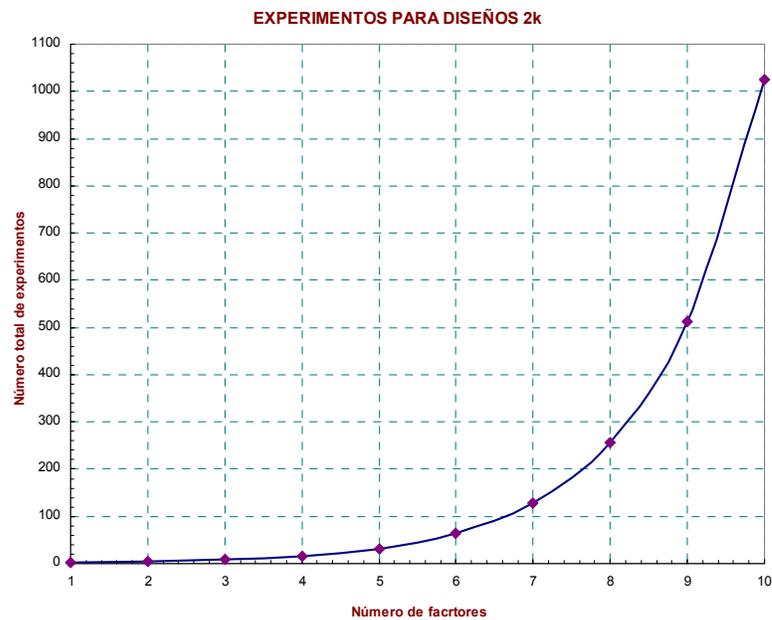


Gráfico 4.4: Experimentos para un diseño factorial a dos niveles y k factores

Como se muestra en la tabla anterior, cuando el número de factores es igual o mayor a 5, un diseño factorial completo requiere un elevado número de experimentos. En estos casos se recomienda la utilización de técnicas experimentales, tales como: diseños factorial fraccionarios [20] o diseños de Plackett-Burman [21].

4.7.1. Descripción

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

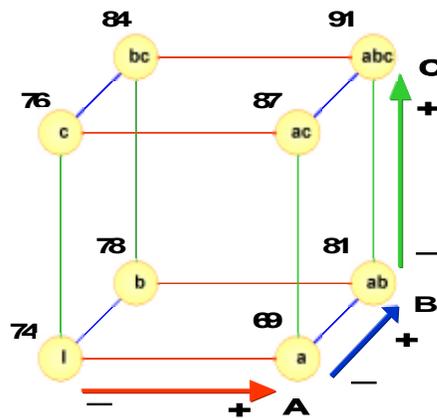


Gráfico 4.5: Representación de un diseño factorial completo a 2 niveles y 3 factores

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

Tabla 4.3: Matriz del diseño para 2 niveles y 3 factores

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

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

Tabla 4.4: Matriz del modelo para 2 niveles y 3 factores

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

4.8. Cálculo del modelo de regresión

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

$$Y = X \cdot b + e \quad (4.3)$$

en forma matricial:

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

El cálculo de los efectos puede efectuarse mediante diferentes algoritmos. Se presentará a continuación el método de regresión de mínimos cuadrados ordinarios (**Ordinary Least Squares, OLS**) [22]:

$$b = (X^T \cdot X)^{-1} \cdot X^T \cdot Y \quad (4.4)$$

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

$$(X^T \cdot X)^{-1} = \begin{bmatrix} 1/8 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1/8 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1/8 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1/8 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 1/8 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1/8 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1/8 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1/8 \end{bmatrix} \quad (4.5)$$

La matriz de dispersión, contiene a lo largo de la diagonal los coeficientes multiplicativos que, multiplicados por el error experimental proporcionan el valor de la varianza de los coeficientes del modelo. Como se puede observar, en el caso de los diseños factoriales, la contribución a la incertidumbre de los coeficientes

causados de cómo se ejecutan los experimentos es igual para todos los factores y las interacciones, y vale $1/n$, donde n es el número de experimentos. Los elementos fuera de la diagonal son los coeficientes multiplicativos del error experimental para el cálculo de la covarianza entre los coeficientes de factores diversos. Esta característica extremadamente importante de los diseños factoriales está ligada a la ortogonalidad de los factores y de las interacciones. De esta forma, utilizando los diseños factoriales la incertidumbre sobre los coeficientes es la misma para todos los coeficientes y la mínima posible.

4.9. Determinación de los efectos significativos

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

Este objetivo se lo puede conseguir mediante la comparación del error experimental y el error sobre el cálculo de los efectos. En ausencia de una evaluación del error experimental, se puede estimar los factores que son diversos de cero, utilizando los gráficos de probabilidad normalizada (normal probability plots) o el método de Lenth [21].

4.9.1. Error experimental

El error experimental [23] es una cantidad que juega un rol extremadamente relevante en todas las metodologías de investigación experimental. A más de su significado intrínseco que va de la mano a la precisión de las medidas experimentales, entre las diversas expresiones que definen la calidad de la experimentación, se tiene: el cálculo de los intervalos de confianza de los coeficientes de regresión y de las respuestas calculadas por un modelo de regresión. El primer aspecto resulta fundamental en la fase inicial de la planificación (screening) donde el objetivo principal es evaluar la relevancia o no de los factores inicialmente tomados en consideración con un número pequeño de experimentos.

Evidentemente todos los coeficientes de regresión relativos a los efectos no relevantes tendrán valores inferiores al error experimental.

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

Para el cálculo de la incertidumbre del efecto es necesario calcular el error experimental mediante réplicas de la misma medida (frecuentemente se realiza un cierto número de réplicas de un experimento ubicado al centro del dominio experimental), o también con réplicas de experimentos diversos. El error experimental sobre la respuesta se podrá calcular a partir de réplicas de un mismo experimento. La varianza de las respuestas para el experimento replicado puede ser utilizada como estimadora del error experimental.

$$s^2 = \frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1} \quad (4.6)$$

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

$$U \exp\left(\frac{\alpha}{2}, g.l.\right) = t\left(\frac{\alpha}{2}, g.l.\right) \cdot \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (4.7)$$

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

variable no significativa en el modelo experimental:

$$b_j < U \exp\left(\frac{\alpha}{2}, g.l.\right) \quad (4.8)$$

variable significativa en el modelo experimental:

$$b_j > U \exp\left(\frac{\alpha}{2}, g.l.\right) \quad (4.9)$$

4.9.2. Normal probability plots

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

Los gráficos de probabilidad normal (Half-Normal Plot) [24] se construyen modificando la escala de las ordenadas en modo que la curva sigmoide se transforme en una recta. Esto se obtiene reportando sobre las ordenadas, no la probabilidad porcentual, sino el valor de Z correspondiente a la probabilidad deseada, donde Z es la variable estandarizada de la función de distribución normal de probabilidad. Dado un cierto número de valores que se suponen tomados de una distribución normal, representándoles sobre este plano, se espera de encontrar alineamiento sobre una recta.

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

$$p_i = \frac{100\%(i - 0.5)}{p} \quad (4.10)$$

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

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

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

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

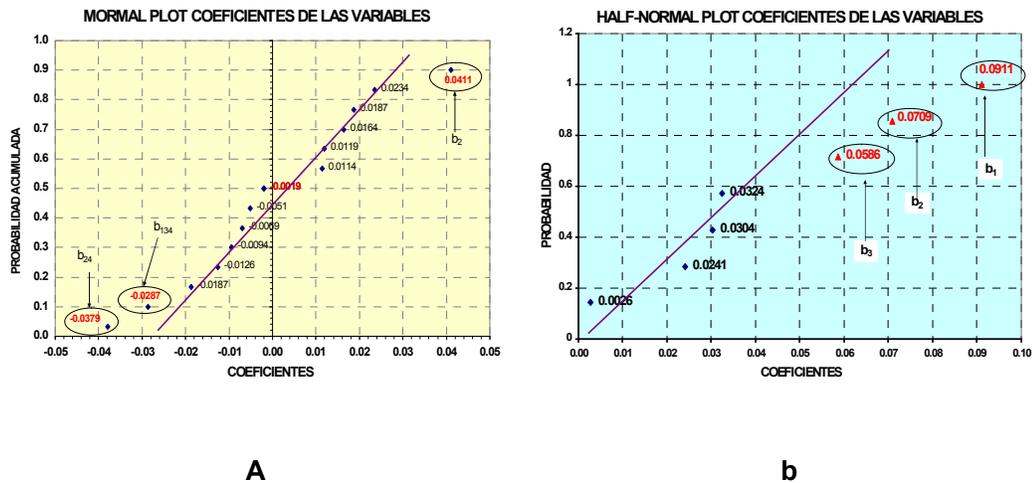


Gráfico 4.6: Normal Probability Plots

(a). Normal Plot.

(b). Half-Normal Plot

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

4.10. Optimización

Los diseños factoriales típicos para los problemas de screening preliminar de los factores relevantes se los consciente para realizar un número mínimo de experimentos suficientes para calcular la importancia o no de cada factor inicialmente considerado, sea únicamente a nivel de efectos principales (diseños de Plackett-Burman) o de efectos principales e interacciones (diseños factoriales). En muchos casos, la solución del problema necesita un modelo más detallado del sistema en estudio. Una primera razón en la búsqueda de una solución optimal es de encontrar las condiciones que corresponden a un mínimo o a un máximo de la respuesta en estudio. La segunda razón radica en la búsqueda de un modelo cuantitativo los que dan mayor detalle para identificar las relaciones entre la respuesta estudiada y los factores relevantes que describen el sistema.

Desde el punto de vista matemático, esto significa introducir en el modelo al menos los términos cuadráticos de los factores en estudio. La presencia de los términos

cuadráticos permite construir curvas de segundo orden visualizables; por ejemplo, superficies de respuesta. Los diseños experimentales que permiten afrontar el problema de la optimización son principalmente los diseños centrales compuestos, diseños de máxima pendiente, de Box-Behnken [25] y los diseños de Doherlet [26].

4.10.1. Método de superficie de respuesta

Las superficies de respuesta [27] se utilizan para determinar un punto óptimo. Adicionalmente, es una buena alternativa gráfica que muestra la relación entre las diferentes variables experimentales y la respuesta. Para poder determinar un óptimo es necesario que la función polinomial contenga términos cuadráticos.

$$Y = b_0 + \sum b_j X_j + \sum b_{jk} X_j X_k + \sum b_{jj} X_j^2 \quad (4.11)$$

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

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

$$\alpha = (n_F)^{1/4} \quad (4.12)$$

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

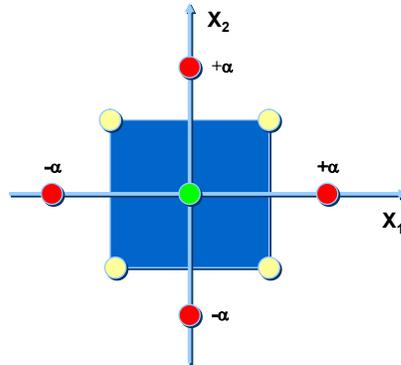


Gráfico 4.7: Esquema de un diseño central compuesto a 2 niveles y 2 variables

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

Tabla 4.5: Matriz del modelo para un diseño central compuesto a 2 niveles y 2 variables

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

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

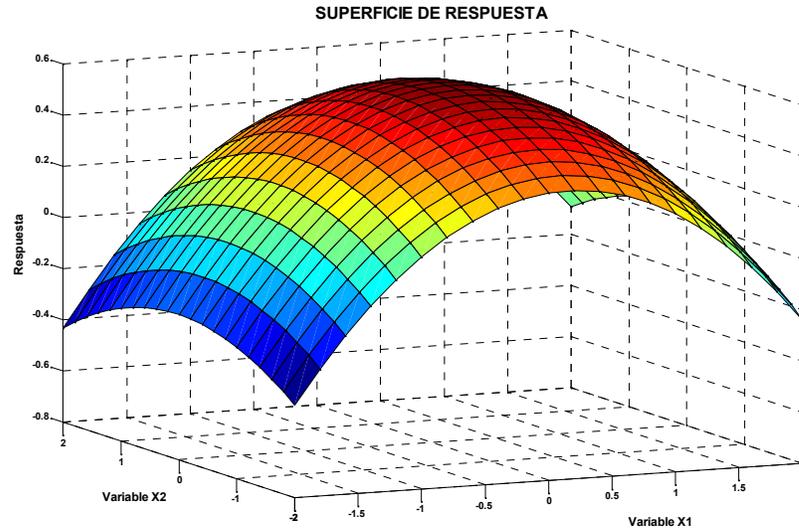


Gráfico 4.8: Modelo de superficie de respuesta cuadrático

4.10.2. Método de la máxima pendiente

El método de la máxima pendiente [20] se basa en la pendiente de la superficie de respuesta, asumiendo un modelo lineal. Ésta se obtiene evaluando los incrementos asignados a cualquier variable en modo de maximizar la respuesta.

$$y = b_0 + \sum_{j=1}^k b_j x_j \quad (4.13)$$

$$y + \Delta y = b_0 + \sum_{j=1}^k b_j (x_j + \Delta x_j) \quad (4.14)$$

$$\Delta y = \sum_{j=1}^k b_j \Delta x_j \quad (4.15)$$

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

$$\Delta x = b.k \quad (4.16)$$

$$\begin{bmatrix} x_1' \\ x_2' \\ \dots \\ x_j' \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} x_1 \\ x_2 \\ \dots \\ x_j \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} \Delta x_1 \\ \Delta x_2 \\ \dots \\ \Delta x_j \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} x_1 \\ x_2 \\ \dots \\ x_j \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} b_1 \\ b_2 \\ \dots \\ b_j \end{bmatrix} \cdot k \quad (4.17)$$

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

4.11. Diseño experimental de mezclas

El diseño de mezclas [34] para la elaboración de nuevos productos, es una de las áreas que ha venido ganado interés entre los productos de alimentos, dado que se pueden realizar combinaciones de productos buscando nuevas características funcionales y optimizar el uso de materias primas.

En el diseño de procesos y productos agroalimentarios, es frecuente acudir a herramientas estadísticas de diseño robusto y experimental para la valoración y optimización para la mezcla de varios componentes o ingredientes. En la elaboración de jugos, néctares, conservas, compotas, mermeladas, cremogenados, yogures, se requiere encontrar la mezcla óptima de ingredientes que permita generar las mejores características organolépticas como físicas, reológicas o químicas, aún mas económica cuando alguno de los componentes es muy costoso. La práctica común como se hace este proceso es ha ensayo y error en donde el investigador ensaya varias combinaciones o mezcla de ingredientes hasta encontrar una que a su criterio sea mejor, pero no la óptima [34].

En este tipo de experimentos los factores que intervienen son las proporciones de los componentes de la mezcla y las respuestas a optimizar son función de esas proporciones con respecto al total y no dependen de la cantidad de cada componente. La forma como se analiza esta forma de diseño es a través de una superficie de respuesta, que es la que permite encontrar la mezcla óptima. Una característica especial de los diseños de mezclas es que la cantidad total de la mezcla normalmente se fija en el diseño de experimentos y la cantidad de cada componente es proporcional a la cantidad total, a demás la proporción en el

experimento de mezclas no puede variar independientemente como en los diseños factoriales porque ellas están restringidas a que la suma sea constante (1-100%).

4.11.1. Diagnóstico y selección de los modelos optimales

Muchos productos están formados por mezclas de dos o más ingredientes. Algunos ejemplos son [28]:

- Formulaciones para pasteles usando levadura, manteca, harina, azúcar.
- Construcción de edificios en concreto formados por la mezcla de arena, agua y uno o más tipos de cemento.
- Cóctel de frutas compuesto de jugos de sandía, piña, naranja, etc.
- Film de fotografía hecho por una mezcla de metal, una o dos parejas de solventes y dos estabilizadores.

En cada caso mencionado, una o más propiedades de cada producto son generalmente de interés para el investigador del experimento quien es el responsable de la mezcla de los ingredientes.

En conclusión, la propiedad de medida del producto final depende de los porcentajes o de las proporciones de cada uno de los ingredientes que están presentes en la formulación. Así en el caso del concreto su dureza o fuerza de compresión está en función de los porcentajes del cemento, arena y agua dentro de la mezcla.

El experimento de mezcla de ingredientes se realiza para determinar si existen dos o más ingredientes que producen un producto de la propiedad más conveniente que la que se obtienen con un solo ingrediente. Por tanto, al variar la composición de los ingredientes variar la propiedad de medida del producto final.

Ejemplo [35]: En un punto experimental, a menudo la razón para el estudio de la estrecha relación funcional entre la propiedad de medida o la respuesta medible y las variables controlables es **(1)** para determinar si alguna combinación de los ingredientes pueden ser considerados mejor en algún sentido, o **(2)** para simplemente ganar un mejor entendimiento del sistema general por el estudio de los roles jugados de los diferentes ingredientes. La mejor combinación de

ingredientes para el experimento podría ser la combinación que produce un sabor más aceptable sin incurrir en un incremento en el costo.

Los aspectos distinguidos del problema de las mezclas es que la variable controlable representa cantidades proporcionales de la mezcla más conveniente que cantidades sin restricciones donde las proporciones son por volumen, peso o por fracción molar. Las proporciones son no negativas, y, sí expresadas como fracciones de la mezcla, éstas necesitan sumar hasta la unidad, especialmente sí son los únicos ingredientes para ser estudiados en el contenido de la mezcla.

Sí la suma de las proporciones de los componentes es menor que la unidad, por ejemplo, sí la suma es igual a 0.80 por que 0.20 de la mezcla está fijada (constante), y se desea solamente con las proporciones de las variables sumadas hasta 0.80, luego las proporciones de las variables son re-escritas como fracciones-escala así que las fracciones escala sumen hasta la unidad. Sí se representa como “**q**” el número de ingredientes en el sistema a estudiar y se representa las proporciones de los ingredientes dentro de la mezcla “**x_i**” se tiene:

$$x_i \geq 0, \quad i = 1, 2, 3, \dots, q \quad (4.18)$$

$$x_i = x_1 + x_2 + \dots + x_q = 1 \quad (4.19)$$

De acuerdo a la ecuación (4.19) la suma de las proporciones de los componentes no negativos o fracciones es 1. Esta última condición (4.19) podría ser la restricción fundamental asignada para las proporciones contenidas en la mezcla experimental [35].

En realidad, desde la ecuación (4.19) una proporción individual **x_i** podría ser la unidad “1”, una mezcla podría ser un solo ingrediente. Así esta mezcla es llamada mezcla pura; éstas son usadas principalmente como marco referencial o como un estándar frente a las cuales los multicomponentes de las mezclas son comparadas.

Por motivo de las restricciones sobre la **x_i** mostradas en las ecuaciones (4.18) y (4.19) la restricción geométrica del factor espacio conteniendo los **q** componentes

compuesto de todos los puntos sobre o dentro de los límites (vértices, lados, caras) de un simplex regular dimensional $(q-1)$.

Para $q=2$ componentes, el simplex factor espacio es una línea recta, representada por el eje horizontal en la **figura 4.1**. Cada mezcla de dos componentes **A** y **B** es representado por un punto sobre la línea o eje.

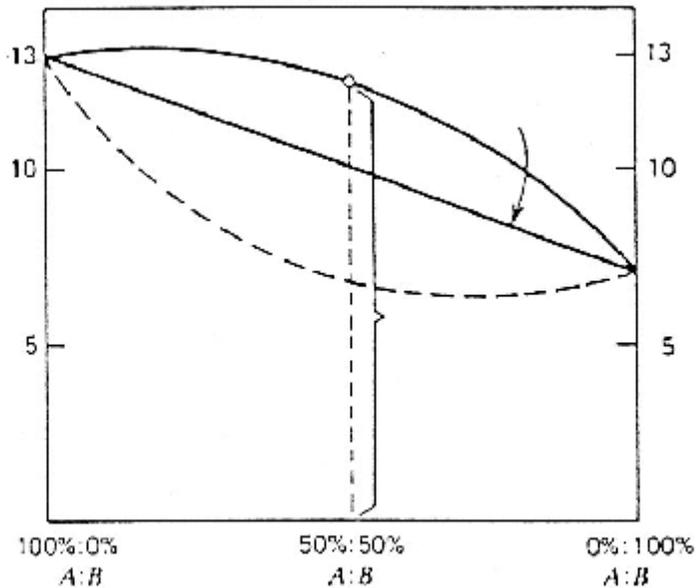


Gráfico 4.9: Dibujo del promedio.

Fuente: IDROVO, A. PALACIOS, A. 2004. Utilización de diseño experimental de mezclas para la formulación y optimización de cóctel de frutas tropicales. Director: Dr. Piero Tripaldi. Universidad el Azuay, Facultad de Ciencia y Tecnología, Escuela de Ingeniería en Alimentos. Pag.49

Con tres componentes $q=3$, el simplex factor espacio es un triángulo equilátero, y para $q=4$ el simplex es un tetraedro.

En la **figura 4.8** está representado el factor espacio por tres componentes 1,2 y 3, cuales proporciones son indicadas por x_1 , x_2 y x_3 . El sistema de coordenadas usada para los valores de x_i , $i = 1,2,\dots, q$, es llamado un sistema de coordenadas simplex.

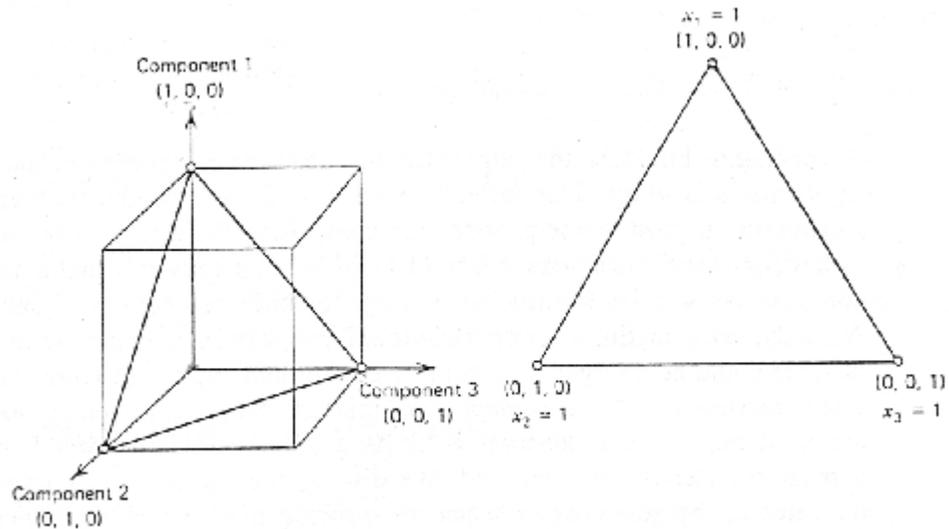


Gráfico 4.10: Región del simplex de tres componentes.

Fuente: ÁLVAREZ, H. SALAMANCA, G. 2007. Valoración metodología para el estudio de mezclas ternarias en sistemas alimentarios. *Alimentos Ciencia e Ingeniería*. Vol. 16(1): 92-96. Ambato-Ecuador. Pag.93

Con tres componentes, por ejemplo, las coordenadas pueden ser dibujadas sobre un papel gráfico triangular que tiene líneas paralelas para los tres lados del triángulo equilátero, visto en la **figura 4.11**.

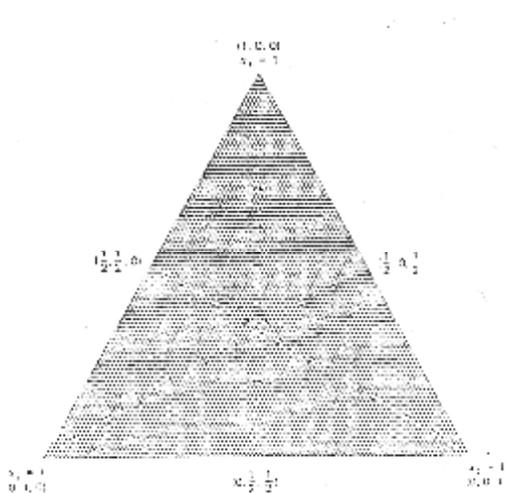


Gráfico 4.11: Coordenadas papel gráfico triangular

Fuente: IDROVO, A. PALACIOS, A. 2004. Utilización de diseño experimental de mezclas para la formulación y optimización de cóctel de frutas tropicales. Director: Dr. Piero Tripaldi. Universidad del Azuay, Facultad de Ciencia y Tecnología, Escuela de Ingeniería en Alimentos. Pag.50

En la **figura 4.10 y 4.11** se observa que los vértices del simplex o triángulo representa la mezcla de un solo componente y son indicadas por $x_i = 1$, $x_j = 0$, para $i, j = 1, 2, y 3$, $i \neq j$. El interior de los puntos del triángulo representa mezclas en el cual ninguno de los tres componentes está ausente, esto es, $x_1 > 0$, $x_2 > 0$ y $x_3 > 0$. El centro del triángulo corresponde a la mezcla con iguales proporciones (1/3, 1/3, 1/3) de cada uno de los componentes. La **figura 4.4** es el tetraedro para los cuatro componentes cuales proporciones son x_1 , x_2 , x_3 y x_4 [35].

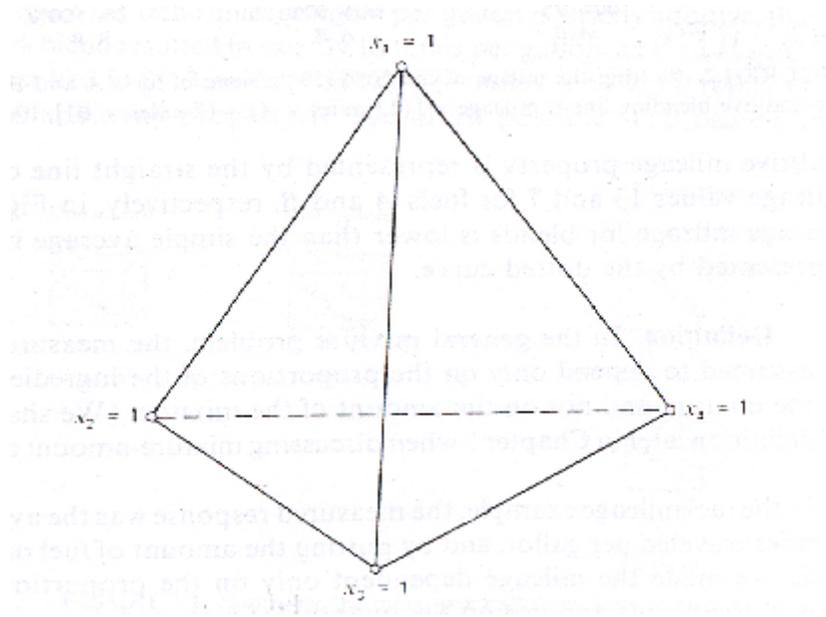


Gráfico 4.12: Tetraedro de cuatro componentes

Fuente: IDROVO, A. PALACIOS, A. 2004. Utilización de diseño experimental de mezclas para la formulación y optimización de cóctel de frutas tropicales. Director: Dr. Piero Tripaldi. Universidad el Azuay, Facultad de Ciencia y Tecnología, Escuela de Ingeniería en Alimentos. Pag.51

Frecuentemente existen situaciones donde alguna de las proporciones x_i no están permitidas para variar desde 0 hasta 1. En vez de esto, algunas o casi todos de las proporciones de los componentes son restringidos por un límite inferior y/o superior. En el caso del componente i , estas restricciones podrían ser escritas como:

$$0 \leq L_i \leq x_i \leq U_i \leq 1, \quad 1 \leq i \leq q$$

Donde L_i es el límite inferior y U_i es el límite superior.

Dentro de muchos trabajos experimentales involucrando mezclas de multicomponentes, el énfasis está sobre el estudio de las características físicas, tanto como la forma o el punto más alto de las repuesta de medida de superficie.

Por ejemplo, se hace un punch de frutas, al mezclar proporciones de jugo de naranja (x_1), jugo de piña (x_2) y jugo de uva (x_3). La repuesta de interés es el más alto sabor de la fruta del punch cuantificado sobre una escala del 1-9 donde 1= no sabe a fruta, 5 = promedio, 9 = extremadamente sabor a fruta. Si la respuesta medida o rango de sabor en este caso, para alguna mezcla de los jugos puede ser representada por la altura perpendicular directamente encima de la mezcla cuales coordenadas están localizadas dentro o no de los límites del triángulo. El sitio de importancia del sabor de la mezcla de los tres jugos puede ser visualizado como una superficie encima del triángulo. Una superficie como esta, la cual es asumida para ser continua por todas las posibles mezclas de jugos está representada en la **figura 4.13**. y el plano del contorno del valor de la superficie de sabor estimada, está representada en la **figura 4.14**. Geométricamente, cada curva del contorno en la **figura 4.14**. es una proyección sobre los tres componentes del triangulo de una sección frontal de la superficie del sabor hecha por un plano, paralelas al triángulo, cortando a través de la superficie a una altura particular. La altura de los cortes o intersecciones del plano que generan el contorno de la curva en la **figura 4.14**. va desde un rango desde 5.8 hasta 6.8.

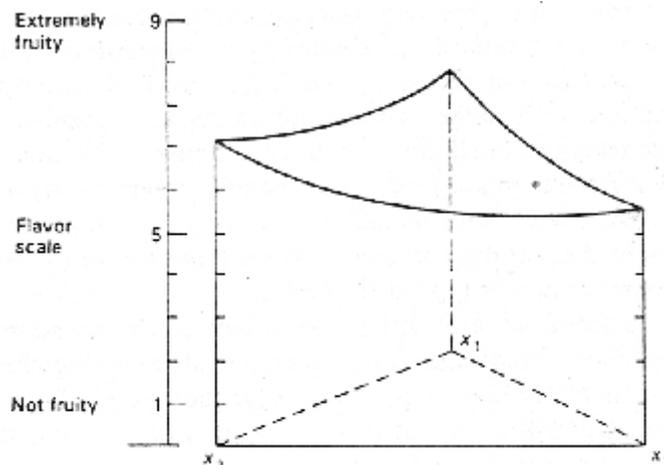


Gráfico 4.13: Superficie del sabor del punch de frutas

Fuente: IDROVO, A. PALACIOS, A. 2004. Utilización de diseño experimental de mezclas para la formulación y optimización de cóctel de frutas tropicales. Director: Dr. Piero Tripaldi. Universidad el Azuay, Facultad de Ciencia y Tecnología, Escuela de Ingeniería en Alimentos. Pag.53

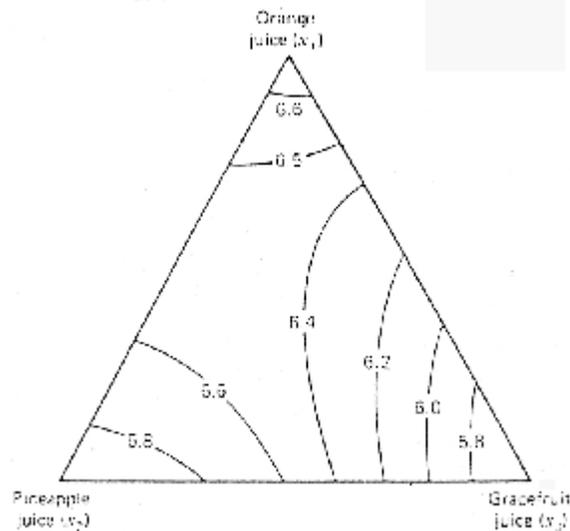


Gráfico 4.14: Contorno de la superficie del sabor constante del punch de fruta.

Fuente: IDROVO, A. PALACIOS, A. 2004. Utilización de diseño experimental de mezclas para la formulación y optimización de cóctel de frutas tropicales. Director: Dr. Piero Tripaldi. Universidad el Azuay, Facultad de Ciencia y Tecnología, Escuela de Ingeniería en Alimentos. Pag.53

Las principales consideraciones conectadas con la exploración de la respuesta de superficie sobre la región simplex son:

- La elección de un modelo propio para aproximarse a la superficie sobre la región de interés.
- La prueba de adecuación del modelo en representación a la respuesta de superficie.
- Un conveniente diseño para coleccionar observaciones.

Para este fin se asume que existen algunas relaciones funcionales

$$\eta = \emptyset (x_1, x_2, \dots, x_q) \quad (4.20)$$

que, en teoría, exactamente describe la superficie. Se escribirá la cantidad η para señalar el valor de la respuesta que es dependiente de las proporciones x_1, x_2, \dots, x_q de los componentes. Una muy básica adopción que se hace es que la respuesta de superficie, representada por la función \emptyset , es descrito para ser una función

continua dentro de x_i , $i = 1, 2, \dots, q$. Estas funciones polinomiales son usadas normalmente de un menor grado como el polinomio de primer grado:

$$\eta = \beta_0 + \sum \beta_i x_i \quad (4.21)$$

o el polinomio de segundo grado:

$$\eta = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ij} x_i x_j \quad (4.22)$$

son las clases de modelos que utilizamos para representar la superficie.

Las ecuaciones de menor grado polinomial son más manejables que las ecuaciones de mayor grado, porque las de menor grado contienen menos términos y así requieren menos valores de respuestas observados en orden para estimar los parámetros (las β 's) en la ecuación. En ocasiones en donde el sistema de estudio es muy complicado se puede aplicar ecuaciones de tercer grado y así sucesivamente [35].

Las propiedades de los polinomios usados para estimar la función de respuesta dependen de un extenso programa específico de experimentos que se llama diseño experimental.

El diseño experimental también define el rango de interés del experimentador con respecto a las proporciones usadas para cada uno de los componentes. Este diseño podría cubrir el entero espacio factor simplex si es el interés del experimentador, utilizando todos los valores de x_i con un rango de 0 hasta 1, para todos $i = 1, 2, \dots, q$, o el diseño podría cubrir solamente una subporción dentro del simplex [35].

4.11.2. Diseño de simplex lattice

Para acomodar una ecuación polinomial para representar la superficie de respuesta sobre la región entera del simplex, una elección natural para un diseño podría ser una de la cual los puntos son esparcidos regularmente sobre todo el espacio factor simplex. Un arreglo ordenado consistiendo de una distribución uniformemente espaciada de puntos sobre un simplex es conocido como un lattice. El nombre lattice es usado para hacer referencia a un orden de puntos [36].

Un lattice podría tener un acuerdo especial para una específica ecuación polinomial. Por ejemplo para un modelo polinomial de grado m en q componentes sobre el simplex, el lattice, (q, m) consiste de puntos cuales coordenadas están definidas por las combinaciones de las proporciones de los componentes; las proporciones asumidas para cada componente toma $m + 1$ iguales valores espaciados desde 0 hasta 1, que es,

$$x_i = 0, \frac{1}{m}, \frac{2}{m}, \dots, 1 \quad (4.23)$$

y (q, m) simplex-lattice consiste de todas las posibles combinaciones de los componentes donde las proporciones de la ecuación (4.6) para cada componente son usadas.

De acuerdo al modelo a utilizar sea este de segundo, tercero, cuarto o quinto grado dependerán los puntos fijados en los límites del simplex.

Ejemplo considerando a $q = 3$ componentes del sistema donde el factor espacio para todas las mezclas es un triángulo equilátero y utilizando un modelo m de segundo grado, el $(3, 2)$ simplex-lattice consiste de 6 puntos sobre los límites del triángulo.

x_1	x_2	x_3
1	0	0
0	1	0
0	0	1
$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	0
0	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$
$\frac{1}{2}$	0	$\frac{1}{2}$

$$(x_1, x_2, x_3) = (1,0,0), (0,1,0), (0,0,1), (1/2,1/2,0), (0,1/2,1/2), (1/2,0,1/2)$$

Los tres puntos, cuales están definidos como:

$$(1,0,0) \text{ o } x_1 = 1, x_2 = x_3 = 0;$$

$(0,1,0)$ o $x_1 = x_3 = 0, x_2 = 1$;

$(0,0,1)$ o $x_1 = x_2 = 0, x_3 = 1$

representan las mezclas de un solo componente y estos puntos son los tres vértices del triángulo [35].

Los puntos $(1/2,1/2,0)$, $(1/2,0,1/2)$, y $(0,1/2,1/2)$ representa las mezclas binarias o mezclas de dos componentes donde $x_i = x_j = 1/2, x_k = 0, k \neq i,j$.

Las mezclas binarias están localizadas en los puntos medios de los tres lados del triángulo.

El simplex-lattice $(3,2)$ se indica en la **figura 4.15**.

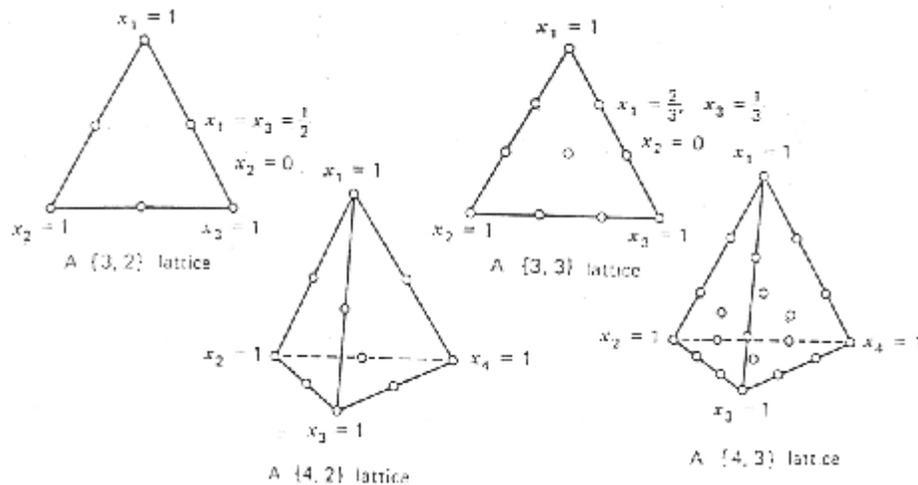


Gráfico 4.15: Algunos arreglos $(3,m)$ y $(4,m)$ simplex-lattice, $m=2$ y $m=3$.

Fuente: IDROVO, A. PALACIOS, A. 2004. Utilización de diseño experimental de mezclas para la formulación y optimización de cóctel de frutas tropicales. Director: Dr. Piero Tripaldi. Universidad el Azuay, Facultad de Ciencia y Tecnología, Escuela de Ingeniería en Alimentos. Pag.57

Nótese que cada una de las proporciones de los componentes dentro de la mezcla es casi la unidad o un número fraccional y la suma de las fracciones es igual a 1. Cuando se dibuja estos puntos representan un orden de componentes de las mezclas que es simétrico con respecto a la orientación del simplex (con respecto a los vértices y lados del simplex). Con tres componentes el sistema de coordenadas

triangular está representado por valores fraccionales en paréntesis (x_1, x_2, x_3) donde cada $0 \leq x_i \leq 1$, $i = 1, 2$ y 3 , y $x_1 + x_2 + x_3 = 1$.

El número de diseño de puntos dentro del (q, m) simplex-lattice se obtiene mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{(q + m - 1)!}{m!(q - 1)!} \quad (4.24)$$

Una alternativa para la ecuación (4.7), para un grado polinomial m en q componentes, sujetos a la restricción sobre los x_i 's en la ecuación (4.2), es derivado al multiplicar uno de los términos en la ecuación (4.7) por la identidad $(x_1 + x_2 + \dots + x_q) = 1$ y simplificar. El resultado de la ecuación es llamado "Canonical" polinomial o la "forma canónica de los polinomios" o simplemente la " (q, m) polinomial". El número de términos en la (q, m) polinomial es $(q+m-1)/(m)$ y este número es igual al número de puntos usados en el diseño de (q, m) simplex-lattice. Por ejemplo, para un $m = 1$ y desde la ecuación:

$$\eta = \beta_0 + \sum \beta_i x_i \quad (4.25)$$

y al multiplicar los β_0 términos por $(x_1 + x_2 + \dots + x_q) = 1$, el resultado de la ecuación es:

$$\eta = \beta_0(\sum x_i) + \sum \beta_i x_i = \sum \beta_i^* x_i \quad (4.26)$$

donde $\beta_i^* = \beta_0 + \beta_i$ para todo $i = 1, 2, \dots, q$. El número de términos en la ecuación (2.3) es q , cual es el número de puntos dentro del $(q, 1)$ lattice. Los parámetros β_i^* , $i = 1, 2, \dots, q$, tiene simple y claro el significado en términos de describir la forma de la respuesta de superficie sobre la región del simplex [35].

El polinomio general de segundo grado en q variables es:

$$\eta = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ii} x_i^2 + \sum \sum \beta_{ij} x_i x_j \quad (4.27)$$

y si nosotros aplicamos las identidades $x_1 + x_2 + \dots + x_q = 1$ y,

$$x_i^2 = x_i (1 - \sum x_{ij}) \quad (4.28)$$

luego para $m = 2$

$$\begin{aligned} \eta &= \beta_0 (\sum x_i) + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ii} x_i (1 - \sum x_j) + \sum \sum \beta_{ij} x_i x_j \\ &= \sum (\beta_0 + \beta_i + \beta_{ii}) x_i - \sum \beta_{ii} x_i \sum x_j + \sum \sum \beta_{ij} x_i x_j \\ &= \sum \beta_i^* x_i + \sum \sum \beta_{ij}^* x_i x_j \end{aligned} \quad (4.29)$$

el número de términos en la ecuación (6.11) es $q(q+1)/2$

La fórmula para un polinomio de tercer grado puede ser derivada al multiplicar la identidad $x_1 + x_2 + \dots + x_q = 1$ al igual que al aplicar la restricción de la ecuación (2.5) para los términos de polinomio general de tercer grado en la ecuación (2.2) y al simplificar los términos como fueron hechos para $(q,2)$ polinomial. El cúbico o $(q,3)$ polinomial es:

$$\eta = \sum \beta_i^* x_i + \sum \sum \beta_{ij}^* x_i x_j + \sum \sum \sum \beta_{ijk}^* x_i x_j x_k \quad (4.30)$$

Una fórmula simple para un caso especial de un polinomio cúbico donde los términos $\beta_{ij} x_i x_j (x_i - x_j)$ no son considerados es el polinomio cúbico especial:

$$\eta = \sum \beta_i^* x_i + \sum \sum \beta_{ij}^* x_i x_j + \sum \sum \beta_{ijk}^* x_i x_j x_k \quad (4.31)$$

Así se quitan los asteriscos. Para los tres componentes, los modelos de ecuación (4.8), (4.28), y (4.30) respectivamente aparecerán así:

$$\begin{aligned} \eta &= \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 \\ \eta &= \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3 \\ \eta &= \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3 + \beta_{123} x_1 x_2 x_3 \end{aligned}$$

El número de términos en los (q,m) polinomiales es una función de m , el grado de la ecuación, así como el número de componentes q . Los números de términos para algunos valores de q son listados en la siguiente tabla 4.6. [35].

Tabla 4.6: El número de términos en el polinomio canónico

Número de componentes q	Lineal	Cuadrática	Cúbica reducida	Cúbica completa
2	2	3	-	-
3	3	6	7	10
4	4	10	14	20
5	5	15	25	35
6	6	21	41	56
7	7	28	63	84
8	8	36	92	120
.
q	q	$q(q+1)/2$	$q(q^2+5)/6$	$q(q+1)(q+2)/6$

4.11.3. Coeficientes polinomiales como funciones de las respuestas en los puntos de los lattices

Se mencionó previamente que existe una especial relación entre los (q,m) simplex-lattice y el (q,m) ecuación polinomial. Esta relación entre uno y otro corresponde al número de puntos en el lattice y el número de términos en el polinomio. Como resultado de esta relación, los parámetros en el polinomio pueden ser expresados como simples funciones de la respuesta esperada en los puntos de los (q,m) simplex-lattice.

La nomenclatura aplicada por Scheffé está dada por:

La respuesta para un componente puro i es escrita por η_i , la respuesta para una mezcla binaria con iguales proporciones (50% : 50%) de componentes i y j son escritos por η_{ij} , la respuesta para una mezcla ternaria con igual proporciones de componentes i, j, k , es escrita por η_{ijk} , la respuesta para una mezcla de cuatro y cinco componentes i, j, k, l, m , es escrita por η_{ijkl} , y η_{ijklm} respectivamente. En la **figura 4.16** la nomenclatura de la respuesta está ilustrada en los puntos de el (3,2) y (3,3) simplex-lattice, respectivamente [35].

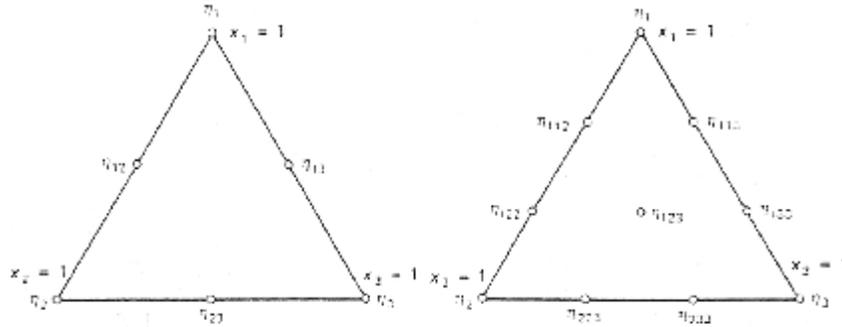


Gráfico 4.16: Nomenclatura de las respuestas en los puntos de el (3,2) y (3,3) simplex-lattice.

Fuente: IDROVO, A. PALACIOS, A. 2004. Utilización de diseño experimental de mezclas para la formulación y optimización de cóctel de frutas tropicales. Director: Dr. Piero Tripaldi. Universidad el Azuay, Facultad de Ciencia y Tecnología, Escuela de Ingeniería en Alimentos. Pag.61

Tabla 4.7: Nomenclatura de las respuestas de Scheffé para tres y cuatro componentes de la mezcla.

Respuesta	x_1	x_2	x_3	x_1	x_2	x_3	x_4
η_1	1	0	0	1	0	0	0
η_2	0	1	0	0	1	0	0
η_{12}	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	0	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	0	0
η_{23}	0	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	0	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	0
η_{123}	3-Jan	3-Jan	3-Jan	3-Jan	3-Jan	3-Jan	0
η_{112}	3-Feb	3-Jan	0	3-Feb	3-Jan	0	0
η_{233}	0	3-Jan	3-Feb	0	3-Jan	3-Feb	0
η_{1112}	$\frac{3}{4}$	$\frac{1}{4}$	0	$\frac{3}{4}$	$\frac{1}{4}$	0	0
η_{1223}	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{4}$	0
η_{1144}				$\frac{1}{2}$	0	0	$\frac{1}{2}$
η_{2344}				0	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{2}$
η_{1234}				$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{4}$

Las ecuaciones para expresar los parámetros en los modelos polinomiales en términos de η_i , η_{ij} , η_{ijk} , η_{ijkl} y η_{ijklm} son dadas por resolver $(q+m-1)/m$ ecuaciones simultáneamente.

Este número corresponde no solo al número de parámetros en la (q,m) ecuación polinomial pero también al número de puntos en el lattice y así el número de respuesta esperada η_i , η_{ij} , medida en los puntos del (q,m) simplex-lattice. Por ejemplo, si el modelo de segundo grado en la ecuación (4.23) es usada para un sistema de tres componentes y se tiene las respuestas esperadas en los puntos del

(3,2) simplex-lattice diseño como se muestra en la **figura 4.16** luego para la ecuación:

$$\eta = \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3 \quad (4.32)$$

si se sustituye

$$\eta_i \quad \text{en } x_i = 1, \quad x_j = 0, \quad i, j = 1, 2, 3 \quad j \neq i$$

$$\eta_{ij} \quad \text{en } x_i = 1/2, \quad x_j = 1/2, \quad x_k = 0 \quad i < j, \quad k \neq i, j$$

dentro de la ecuación (4.30), la siguiente $(3+2-1)/2 = 6$ ecuaciones resultantes

$$\eta_1 = \beta_1, \quad \eta_2 = \beta_2, \quad \eta_3 = \beta_3,$$

$$\eta_{12} = \beta_1(1/2) + \beta_2(1/2) + \beta_{12}(1/4)$$

$$\eta_{13} = \beta_1(1/2) + \beta_3(1/2) + \beta_{13}(1/4)$$

$$\eta_{23} = \beta_2(1/2) + \beta_3(1/2) + \beta_{23}(1/4)$$

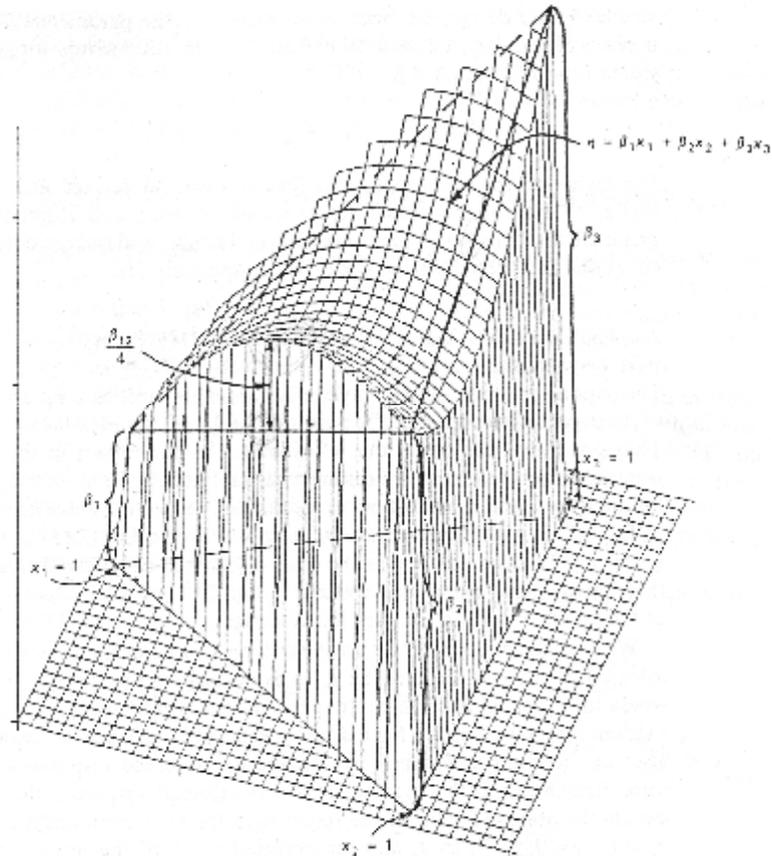
Resolviendo las seis ecuaciones simultáneamente, y esto es posible desde el número de ecuaciones es igual al número de parámetros no conocidos, nosotros encontramos que las fórmulas para los parámetros β_i y β_{ij} , $i, j = 1, 2, 3$, $i < j$, son

$$\begin{aligned} \beta_1 &= \eta_1, & \beta_{12} &= 4\eta_{12} - 2\eta_1 - 2\eta_2 \\ \beta_2 &= \eta_2, & \beta_{13} &= 4\eta_{13} - 2\eta_1 - 2\eta_3 \\ \beta_3 &= \eta_3, & \beta_{23} &= 4\eta_{23} - 2\eta_2 - 2\eta_3 \end{aligned} \quad (4.33)$$

el parámetro β_i representa la respuesta para un componente puro i , y β_{ij} es un contraste que compara la respuesta en el medio punto del corte conectando los vértices de componentes i y j con la respuesta en los vértices de componentes. Así, en el polinomio de seis, términos ecuación (4.32), la suma $\beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3$ representa una mezcla lineal de los tres componentes mientras que los términos

extra $\beta_{ij}x_i x_j$, $i < j$, son tomados para representar medidas de partida desde un plano del resultado de segundo grado de superficie desde las mezclas no aditivas de los componentes. Mostradas en la **figura 4.17**, es la partida $\beta_{12} / 4$ de la superficie, directamente encima $x_1 = x_2 = 1/2$, del plano definido por:

$$\eta = \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3$$



**Gráfico 4.17: Superficie del plano
definido por $\eta = \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3$**

Fuente: IDROVO, A. PALACIOS, A. 2004. Utilización de diseño experimental de mezclas para la formulación y optimización de cóctel de frutas tropicales. Director: Dr. Piero Tripaldi. Universidad el Azuay, Facultad de Ciencia y Tecnología, Escuela de Ingeniería en Alimentos. Pág. 63

Ecuación (4.33.) son derivadas usando solamente tres componentes por razones de conveniencia. Es fácil demostrar la respuesta esperada en los puntos del (3,2) simplex-lattice y solo seis ecuaciones son necesarias para el conjunto de fórmulas

para los β_i y β_{ij} , i, j y $3, i < j$. Para el caso general de q componentes en donde el modelo de segundo grado de la ecuación (4.33) contiene $q(q+1)/2$ términos y la respuesta esperada son posesionados en los puntos de un $(q, 2)$ simplex-lattice diseño, las fórmulas para expresar los parámetros β_i y β_{ij} , en términos de η_i y η_{ij} , son idénticos a la ecuación (4.33). En otras palabras, por lo general q , donde $i, j = 1, 2, \dots, q, i < j$, [35].

$$\beta_i = \eta_i \quad \beta_{ij} = 4\eta_{ij} - 2(\eta_i + \eta_j) \quad (4.34)$$

4.12. Diseño de mezclas con variables de proceso

Los diseños de experimentos emplean variables de procesos o variables de mezclas, sin embargo existen varios procesos en la industria que son dependientes de ambos tipos de variables. Para solucionar este problema surgieron los diseños mixtos o diseños de mezclas con variables de proceso. Estos diseños permiten tener modelos que describen mejor los procesos [35].

En la figura se muestra la representación gráfica de los puntos experimentales para dos problemas que pueden ser resueltos con diseños mixtos [37].

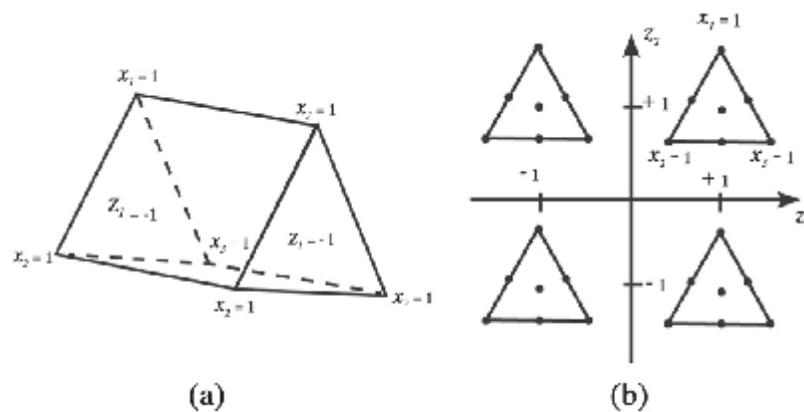


Gráfico 4.18: Representación gráfica de dos diseños mixtos

(a). Tres variables de mezcla y una variable de proceso a dos niveles.

(b). Tres variables de mezcla y dos variables de proceso a dos niveles.

Fuente: CORNELL, Jhon A. 1990. *Experiments with mixtures*. Second edition. Jhon Wiley and

Las variables de proceso son factores que no forman parte de la mezcla de un experimento, pero cuando cambian sus niveles, pueden afectar las propiedades de la mezcla de ingredientes [35].

Si se desea saber si alguna variable de proceso afecta del mismo modo a todas las mezclas se debe realizar una transformación a los términos que incluyen a la variable de proceso y las variables de mezcla, la cual consiste en hacer desaparecer una variable de mezcla en virtud de la restricción de unicidad ($x_1 + x_2 + x_3 = 1$). Para que se cumpla la hipótesis el término que incluye la variable de proceso debe ser significativo, mientras las restantes asociadas a la transformación realizada no deben ser significativas. A continuación se muestra el modelo general para este tipo de diseño [35].

$$y = \beta_1 \cdot (A) \cdot x_1 + \beta_2 \cdot (A) \cdot x_2 + \beta_{12} \cdot (A) \cdot x_{12} \\ = \gamma_1^0 \cdot x_1 + \gamma_2^0 \cdot x_2 + \gamma_{12}^0 \cdot x_1 \cdot x_2 + \sum_{l=1}^2 (\gamma_1^l \cdot x_1 + \gamma_2^l \cdot x_2 + \gamma_{12}^l \cdot x_1 \cdot x_2) \cdot A^l \quad (4.35)$$

En la anterior ecuación A representa la variable cantidad y los niveles en los que se decide experimentar dicha variable [35].

4.12.1. Ajuste de un modelo cuadrático mixto en presencia de variables de proceso.

Con la elaboración de vinilo para el cobertor de asiento del automóvil, las mezclas de formulaciones implican varios tipos de componentes (plastificantes, estabilizantes, lubricantes, agentes de secado, y resinas). Un experimento preliminar se creó para estudiar tres plastificantes donde el porcentaje de la fórmula total aportado por los plastificantes (solos o en combinación con los demás) es: 40.7%. Los porcentajes del resto de componentes se mantienen fijos en todas las mezclas estudiadas, donde la suma de sus partes, en peso, constituyen 59.3% del total. Un {3,2} simplex-lattice se eligió para mirar cada plastificante por sí mismo, así como para estudiar las combinaciones de los plastificantes, dos a la vez, las proporciones de los tres los plastificantes se denotan por X_1 , X_2 , y X_3 [35].

Se incluyó también en el experimento dos variables de proceso, el tipo de extrusión (z_1) y la temperatura de secado (z_2), cada uno en dos niveles. Se estableció un arreglo factorial 2^2 en los dos tipos de extrusión y dos temperaturas de secado, y

los niveles de las variables codificadas se definen como $z_1 = \pm 1$, y $z_2 = \pm 1$. El programa experimental consistió en los siguientes pasos [35]:

1. Preparar cuatro grupos de las seis diferentes formulaciones de plastificantes, seleccionar uno de los grupos al azar y probar en el nivel bajo de extrusión y en alta temperatura de secado ($Z_1 = -1$, $Z_2 = +1$).
2. Seleccionar un segundo grupo de las seis formulaciones de plastificante y probar en el nivel alto de extrusión y baja temperatura de secado. ($Z_1 = +1$, $Z_2 = -1$).
3. Seleccionar otro grupo de las seis formulaciones de plastificante y probar en el nivel bajo de extrusión y baja temperatura de secado ($Z_1 = -1$, $Z_2 = -1$).
4. Seleccionar otro grupo de las seis formulaciones de plastificante y probar en el nivel alto de extrusión y alta temperatura de secado ($Z_1 = +1$, $Z_2 = +1$).
5. Repetir los experimentos en (3).
6. Repetir los experimentos en (1).
7. Repetir los experimentos en (4).
8. Repetir los experimentos en (2).

En la tabla 4.8. se enumeran los valores de las respuestas medidas de 24 mezclas de componentes con variables de proceso, en cada una de las dos repeticiones. La respuesta medida es un valor de espesor de vinilo, los valores de espesor se han ampliado para facilitar los cálculos [35].

Tabla 4.8: Valores de vinilo grueso de las seis mezclas plastificantes. Cuando se analizaron en el tipo de extrusión por cuatro combinaciones de temperatura de secado

Plasticizer Proportion			Process Variable Setting		Scaled Thickness Value (y)		s_j^2
x_1	x_2	x_3	z_1	z_2	Replica 1	Replica 2	
1	0	0	-1	-1	7	8	0.9
0	1	0			4	4	
0	0	1			5	7	
1/2	1/2	0			7	8	
1/2	0	1/2			8	10	
0	0	1/2			4	3	
1	0	0	-1	+1	10	13	5.5
0	1	0			8	8	
0	0	1			3	7	
1/2	1/2	0			12	16	
1/2	0	1/2			9	13	
0	0	1/2			7	10	
1	0	0	+1	-1	10	12	1.4
0	1	0			5	8	
0	0	1			9	8	
1/2	1/2	0			14	15	
1/2	0	1/2			12	11	
0	0	1/2			8	7	
1	0	0	+1	+1	6	5	1.3
0	1	0			7	4	
0	0	1			6	7	
1/2	1/2	0			5	5	
1/2	0	1/2			4	6	
0	0	1/2			7	8	

Fuente: CORNELL, Jhon A. 1990. *Experiments with mixtures*. Second edition. Jhon Wiley and Sons, Inc. USA Pág. 379

El primer paso en el análisis de datos de los 48 valores, es ajustar la mezcla a un modelo cuadrático a 12 valores de espesor de la escala de vinilo en cada una de las cuatro condiciones de procesamiento. Los cuatro modelos son:

At $j=1$ or $z_1 = -1, z_2 = -1$:

$$\begin{aligned}
\hat{y}(x) &= b_{1(1)}x_1 + b_{2(1)}x_2 + b_{3(1)}x_3 + b_{12(1)}x_1x_2 + b_{13(1)}x_1x_3 + b_{23(1)}x_2x_3 \\
&= 7.5x_1 + 4.0x_2 + 6.0x_3 + 7.0x_1x_2 + 9.0x_1x_3 - 6.0x_2x_3 \\
(0.7) & \qquad \qquad \qquad (3.3)
\end{aligned} \tag{4.36}$$

At $j=2$ or $z = -2, z_2 = +1$:

$$\begin{aligned}
\hat{y}(x) &= b_{1(2)}x_1 + b_{2(2)}x_2 + b_{3(2)}x_3 + b_{12(2)}x_1x_2 + b_{13(2)}x_1x_3 + b_{23(2)}x_2x_3 \\
&= 11.5x_1 + 8.0x_2 + 5.0x_3 + 17.0x_1x_2 + 11.0x_1x_3 \\
(1.7) & \qquad \qquad \qquad (8.1) \\
& - 8.0x_2x_3
\end{aligned} \tag{4.37}$$

At $j=3$ or $z = +1, z_2 = -1$:

$$\begin{aligned}
\hat{y}(x) &= b_{1(3)}x_1 + b_{2(3)}x_2 + b_{3(3)}x_3 + b_{12(3)}x_1x_2 + b_{13(3)}x_1x_3 + b_{23(3)}x_2x_3 \\
&= 11.0x_1 + 6.5x_2 + 8.5x_3 + 23.0x_1x_2 + 7.0x_1x_3 \\
(0.8) & \qquad \qquad \qquad (4.1) \\
& - 0.0x_2x_3
\end{aligned} \tag{4.38}$$

At $j=4$ or $z = +1, z_2 = +1$:

$$\begin{aligned}
\hat{y}(x) &= b_{1(4)}x_1 + b_{2(4)}x_2 + b_{3(4)}x_3 + b_{12(4)}x_1x_2 + b_{13(4)}x_1x_3 + b_{23(4)}x_2x_3 \\
&= 5.5x_1 + 5.5x_2 + 6.5x_3 - 2.0x_1x_2 - 4.0x_1x_3 + 6.0x_2x_3 \\
(0.8) & \qquad \qquad \qquad (4.0)
\end{aligned} \tag{4.39}$$

Los números en paréntesis significan los coeficiente estimados de $b_{1(j)}$ y $b_{12(j)}$ en los modelos (4.36) a (4.39), son los errores estándar estimados de $b_{k(j)}$ y $b_{kk'(j)}$, respectivamente, para cada uno del modelo [35].

El siguiente paso en el análisis de los 48 datos, es ajustar el modelo de regresión de tipo combinado, mediante mínimos cuadrados ordinarios y configurar la tabla ANOVA, expresando los coeficientes estimados con tres decimales, el modelo combinado ajustado es

$$\begin{aligned}
\hat{y}(x, y) &= \sum_{k=1}^3 g_k^0 x_k + \sum_{k < k'}^3 g_{kk'}^0 x_k x_{k'} + \sum_{l=1}^2 \left[\sum_{k=1}^3 g_k^l x_k + \sum_{k < k'}^3 g_{kk'}^l x_k x_{k'} \right] z_l + \left[\sum_{k=1}^3 g_k^{12} x_k + \sum_{k < k'}^3 g_{kk'}^{12} x_k x_{k'} \right] z_1 z_2 \\
&= 8.8775 x_1 + 6.000 x_2 + 6.500 x_3 + 11.250 x_1 x_2 + 5.750 x_1 x_3 \\
&\quad (0.7) \quad (0.7) \quad (0.7) \quad (1.9) \quad (1.9) \\
&+ 2.000 x_2 x_3 - 6.250 x_1 z_1 + 0.000 x_2 z_1 + 1.000 x_3 z_1 \\
&\quad (1.9) \quad (0.5) \quad (0.5) \quad (0.5) \\
&+ 0.750 x_1 x_2 z_2 - 4.250 x_1 x_3 z_1 + 1.000 x_2 x_3 z_1 - 0.375 x_1 z_2 \\
&\quad (1.9) \quad (1.9) \quad (1.9) \quad (0.5) \\
&+ 0.750 x_2 z_2 - 7.500 x_3 z_2 - 3.750 x_1 x_2 z_2 - 2.250 x_1 x_3 z_2 \\
&\quad (0.5) \quad (0.5) \quad (1.9) \quad (1.9) \\
&+ 5.000 x_2 x_3 z_2 - 2.375 x_1 z_1 z_2 - 1.250 x_2 z_1 z_2 - 0.250 x_3 z_1 z_2 \\
&\quad (1.9) \quad (0.5) \quad (0.5) \quad (0.5) \\
&- 8.750 x_1 x_2 z_1 z_2 - 3.250 x_1 x_3 z_1 z_2 - 2.000 x_2 x_3 z_1 z_2 \\
&\quad (1.9) \quad (1.9) \quad (1.9)
\end{aligned} \tag{4.40}$$

Los errores estándar estimados de los coeficientes en (4.40) se calculan utilizando las fórmulas:

$$\begin{aligned}
\hat{\text{var}}(g_k^0) &= \frac{\text{MSR} + (m-1)\text{MSE}}{m\text{Pr}} \\
\hat{\text{var}}(g_k^1) &= \hat{\text{var}}(g_k^{12}) = \frac{\text{MSRZ} + (m-1)\text{MSE}}{m\text{Pr}}
\end{aligned} \tag{4.41}$$

$$\hat{\text{var}}(g_{kk'}^0) = \hat{\text{var}}(g_{kk'}^1) = \hat{\text{var}}(g_{kk'}^{12}) = \frac{24\text{MSE}}{\text{Pr}}$$

$$t = \frac{g_{kk'}^0}{\sqrt{\frac{24\text{MSE}}{\text{Pr}}}}, \quad t = \frac{g_{kk'}^1}{\sqrt{\frac{24\text{MSE}}{\text{Pr}}}}, \quad t = \frac{g_{kk'}^{12}}{\sqrt{\frac{24\text{MSE}}{\text{Pr}}}} \tag{4.42}$$

y las cantidades cuadráticas en la tabla de ANOVA.

Tabla 4.9: ANOVA

Source	d.f.	SS	MS	F
Reps (R)	1	14.0833	14.083	
Main-plot (Z)	3	170.167	56.722	10.80 > $F_{(3,3,0.05)} = 9.28$
Main-plot error(RZ)	3	15.750	5.250	
Sub-plot (X)	5	118.917	23.783	18.90 > $F_{(5,20,0.01)} = 4.10$
Main x sub int. (ZX)	15	125.583	8.372	6.65 > $F_{(15,20,0.01)} = 3.09$
Sub-plot error	20	25.167	1.258	
Total	47	469.667		

Fuente: CORNELL, Jhon A. 1990. *Experiments with mixtures*. Second edition. Jhon Wiley and Sons, Inc. USA Pág. 381

$$\hat{\text{var}}(g_k^0) = \frac{14.083 + (5)1.258}{48}, \quad \hat{\text{var}}(g_k^1) = \hat{\text{var}}(g_k^{12}) = \frac{5.250 + 5(1.258)}{48},$$

$$= 0,424 \quad \quad \quad = 0.240$$

Los cálculos son:

$$\hat{\text{var}}(g_{kk'}^0) = \hat{\text{var}}(g_{kk'}^1) = \hat{\text{var}}(g_{kk'}^{12}) = \frac{24(1.258)}{48} = 3.774$$

y

$$\sqrt{0.424} = 0.65 \text{ or } 0.7, \quad \sqrt{0.240} = 0.49 \text{ or } 0.5, \quad \sqrt{3.774} = 1.94 \text{ or } 1.9$$

La prueba de hipótesis sobre los coeficientes de la ecuación. (4.40) se realizaron con el t-estadístico para los coeficientes $\gamma_{k'}^{l'}, k = 1,2,3; l' = 1,2,12$, donde el número de grados de libertad, ν , se estableció en el $\nu = 12$ usando la ecuación.

$$\nu = \frac{[\text{MSRZ} + (m-1)\text{MSE}]^2}{\frac{\text{MSRZ}^2}{(P-1)(r-1)} + \frac{[(m-1)\text{MSE}]^2}{(m-1)P(r-1)}} \quad (4.43)$$

El estadístico t en (4.42) se utilizó para probar los coeficientes $\gamma_{kk'}^{l'}, kk' = 12,13,23$, $l' = 1,2,12$ donde el número de grados de libertad para el estadístico t en la ecuación . (4.42) es 20. Las estimaciones de los coeficientes en (4.40) que se cree

que son significativamente diferentes de cero, es decir, $[t] \gg t_{12,0.025} = 2,179$ $[t] \gg t_{20,0.025} = 2,086$, en el $\alpha = 0,05$, con sus valores t-calculados entre paréntesis, los niveles significativos son:

$$\begin{aligned} g_{12}^0 &= 11.250 \quad (t = 5.60), & g_{23}^2 &= 5.000 \quad (t = 2.57) \\ g_2^{12} &= -1.250 \quad (t = -2.55), & g_{23}^0 &= 5.750 \quad (t = 2.96) \\ g_1^{12} &= -2.375 \quad (t = -4.84), & g_{23}^2 &= -8.750 \quad (t = -4.50) \end{aligned}$$

Los resultados que prueban la hipótesis sobre los valores de los coeficientes en la parte de regresión del modelo ayuda a explicar el aspecto del factor que se obtiene usando F-test

		Rate of Extrusion (Z_1)	
		Low	High
Low	7.5	11	
High	11.5	5.5	

Con este ejemplo, se ha demostrado que es posible ajustar un tipo de modelo de regresión de datos conseguidos de un diseño Split-plot, donde la mezcla de componentes de una mezcla son incluidos en dos o más condiciones de proceso.

4.13. Función utilidad

Las funciones de utilidad y deseabilidad, son funciones conocidas como métodos MCDM (Multi Criteria Decision Making). El enfoque es la forma más simple y fácil de entender la toma de decisiones en una variedad de fondos ya que no requiere, más que restricciones fuertes en las estructuras de preferencia que la fórmula de agregación. Se basan en la definición de valor parcial, es decir, una transformación de función t , para cada criterio con el fin de estandarizar el valor parcial de la función de la transformación de los valores de los criterios a la misma escala. Típicamente las mejores y peores condiciones deben estar definidas para cada criterio. Esto podría hacerse a nivel local, teniendo simplemente la mejor y peor de las alternativas disponibles, o más general mente como la mejor o peor condición posible en contextos similares [29]. Con este fin, se pueden utilizar diferentes tipos de funciones, las más comunes son [28]:

1. Función Lineal
2. Función Logarítmica

3. Función Sigmoidal
4. Función a Escala
5. Función a Cartón
6. Función Triangular
7. Función Parabólica
8. Función Lineal inversa
9. Función Triangular inversa

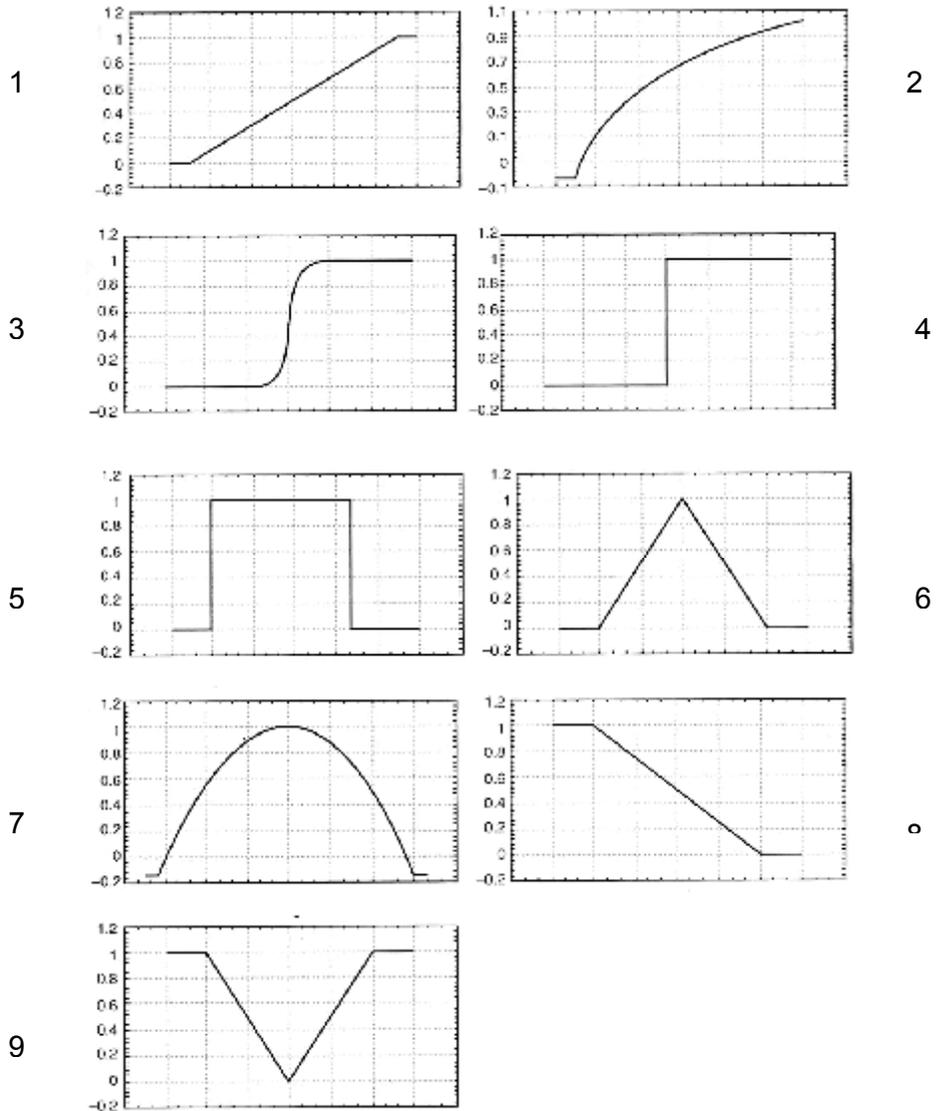


Gráfico 4.19: Funciones de utilidad.

Fuente: IDROVO, A. PALACIOS, A. 2004. Utilización de diseño experimental de mezclas para la formulación y optimización de cóctel de frutas tropicales. Director: Dr. Piero Tripaldi. Universidad el Azuay, Facultad de Ciencia y Tecnología, Escuela de Ingeniería en Alimentos. Pág. 70

El enfoque es muy similar a la función de deseabilidad; cada criterio es independiente transformando en una utilidad u_r por una función que transforma el valor actual de cada elemento en un valor entre 0 y 1.

$$u_{ir} = f_r(y_{ir}) \quad 0 \leq u_{ir} \leq 1 \quad (4.44)$$

En donde:

r = es el criterio seleccionado

f = es la función seleccionada

y_{ir} = es el valor real del elemento i-th para el criterio r-th

una vez que el tipo de función y su tendencia para cada criterio, se ha definido, la utilidad U global de cada elemento i-th se define como:

$$U_i = \frac{\sum_{r=1}^R U_{ir}}{R} \quad 0 \leq U_i \leq 1 \quad (4.45)$$

en el caso de la función utilidad ponderada la utilidad global se calcula como:

$$U_i = \sum_{r=1}^R W_r * U_{ir} \quad 0 \leq U_i \leq 1 \quad (4.46)$$

$$\text{con: } U_i = \sum_{r=1}^R W_r = 1$$

En este caso la función global de utilidad es calculada con menos severidad: de hecho, la calidad global de un elemento puede ser alto si una sola función de utilidad es cero.

Como las funciones de deseabilidad, las funciones de utilidad son afectadas por la arbitrariedad en relación con la selección de las funciones y correspondientes límites superior e inferior. Ambas funciones deseabilidad y utilidad son muy fáciles de calcular, por lo tanto no requieren de un software específico [29].

CAPITULO V: RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1. Etapa 1: Hidrólisis enzimática de la lactosa

La primera etapa del estudio fue la hidrólisis enzimática sobre la lactosa de la leche. Las variables que se consideraron en esta etapa fueron tres: 1.Cantidad de enzima (HA-LACTASA 5200) expresada en mililitros por litro de leche, 2.Tiempo de incubación en minutos y 3.Temperatura expresada en grados centígrados, estas variables se consideran influyentes en el proceso de hidrólisis de la lactosa.

Con las variables antes mencionadas se aplicó un diseño factorial completo a dos niveles. Los valores considerados se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 5.1: Variables y condiciones experimentales

ID	Variable	Unidad	Mínimo (-1)	Centro (0)	Máximo (+1)
X ₁	Enzima	ml/lt	0.2	0.3	0.4
X ₂	Tiempo	min	120	240	360
X ₃	Temperatura	°C	34	37	40

Los experimentos realizados fueron un total de 8, resultantes de un diseño experimental 2³. Además de estos experimentos se desarrollaron 6 replicas, con los valores centrales de la tabla 1. En cada experimento y replica desarrollados se tomaron 6 muestras originales y 6 muestras finales para medir el punto crioscópico de cada una de ellas y se obtuvo su respectivo promedio.

Tabla 5.2: Valores del punto crioscópico de las muestras iniciales

Exp	X ₁	X ₂	X ₃	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	M ₅	M ₆	M.medio
1	-1	-1	-1	-0.5249	-0.5267	-0.5289	-0.5267	-0.5292	-0.5266	-0.5272
2	1	-1	-1	-0.5295	-0.5289	-0.5360	-0.5291	-0.5288	-0.5222	-0.5291
3	-1	1	-1	-0.5155	-0.5282	-0.5261	-0.5294	-0.5260	-0.5247	-0.5250
4	1	1	-1	-0.5211	-0.5243	-0.5275	-0.5286	-0.5279	-0.5275	-0.5262
5	-1	-1	1	-0.5301	-0.5300	-0.5275	-0.5271	-0.5298	-0.5283	-0.5288
6	1	-1	1	-0.5233	-0.5294	-0.5286	-0.5278	-0.5251	-0.6707	-0.5508
7	-1	1	1	-0.5320	-0.5330	-0.5313	-0.5317	-0.5323	-0.5295	-0.5316
8	1	1	1	-0.5262	-0.5279	-0.5281	-0.5282	-0.5281	-0.5275	-0.5277
R1	0	0	0	-0.5525	-0.6155	-0.5205	-0.5279	-0.5290	-0.5293	-0.5458
R2	0	0	0	-0.5303	-0.5329	-0.5299	-0.5316	-0.5304	-0.5303	-0.5309
R3	0	0	0	-0.5330	-0.5274	-0.5288	-0.5300	-0.5291	-0.5307	-0.5298
R4	0	0	0	-0.5138	-0.5270	-0.5263	-0.5273	-0.5262	-0.5257	-0.5244
R5	0	0	0	-0.5201	-0.5216	-0.5229	-0.5225	-0.5216	-0.5229	-0.5219
R6	0	0	0	-0.5217	-0.5231	-0.5209	-0.5196	-0.5186	-0.5208	-0.5208

Como se observa en la tabla 5.2. Se tomaron seis muestras denominadas M₁, M₂, M₃, M₄, M₅, y M₆, correspondientes a los puntos crioscópico iniciales, posteriormente con los datos obtenidos se calculó el promedio de las muestras iniciales sin hidrólisis, (M. medio).

Tabla 5.3: Valores del punto crioscópico de las muestra luego de la hidrólisis

Exp	X ₁	X ₂	X ₃	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C.medio
1	-1	-1	-1	-0.6216	-0.6269	-0.6169	-0.6347	-0.6323	-0.6279	-0.6267
2	1	-1	-1	-0.7136	-0.7231	-0.7126	-0.7103	-0.7159	-0.7172	-0.7155
3	-1	1	-1	-0.7188	-0.7151	-0.7147	-0.7177	-0.7173	-0.7237	-0.7179
4	1	1	-1	-0.7545	-0.7537	-0.7517	-0.7478	-0.7494	-0.7513	-0.7514
5	-1	-1	1	-0.5233	-0.5294	-0.5286	-0.5278	-0.5251	-0.6707	-0.5508
6	1	-1	1	-0.8074	-0.7336	-0.7272	-0.7333	-0.7360	-0.8393	-0.7628
7	-1	1	1	-0.7239	-0.7245	-0.7223	-0.7215	-0.7247	-0.7214	-0.7231
8	1	1	1	-0.7736	-0.7515	-0.7562	-0.7549	-0.7560	-0.7576	-0.7583
R1	0	0	0	-0.7216	-0.7358	-0.7341	-0.7396	-0.7995	-0.7371	-0.7446
R2	0	0	0	-0.7161	-0.7232	-0.7200	-0.7978	-0.7279	-0.7281	-0.7355
R3	0	0	0	-0.7416	-0.7340	-0.8484	-0.7400	-0.8222	-0.7383	-0.7708
R4	0	0	0	-0.7201	-0.7244	-0.7282	-0.7248	-0.7247	-0.7298	-0.7253
R5	0	0	0	-0.6994	-0.6938	-0.7038	-0.7009	-0.7012	-0.7022	-0.7002
R6	0	0	0	-0.6974	-0.7057	-0.7026	-0.7076	-0.7071	-0.7078	-0.7047

En la tabla 5.3. Los valores del punto crioscópico después de la hidrólisis se denominaron C₁, C₂, C₃, C₄, C₅, y C₆, y posteriormente con estos valores se calculó el promedio de las muestras luego de la hidrólisis, llamado C. medio.

Con el valor promedio del punto crioscópico de cada experimento se calculó el porcentaje de hidrólisis antes y después de la incubación de la enzima. El porcentaje de hidrólisis se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$H\% = \frac{Y - 537}{2,74} \quad [16]$$

En donde:

$$Y = H^{\circ} * 1000$$

$$H^{\circ} = \frac{-C^{\circ}}{f} \quad [30]$$

$$f = 0.9658$$

- f = Valor constante
 H° = Grados Horvet
 C° = Grados Centígrados (correspondientes a los valores medios del punto crioscópico.)
 Y = Grados Horvet multiplicados por mil.
 H% = Porcentaje de hidrólisis

Con los valores de la matriz del modelo y los porcentajes de hidrólisis obtenidos, se determinaron los coeficientes del modelo de regresión, es decir se realizó el screening.

El screening permitió determinar cuáles son las variables experimentales y cuáles las interacciones que tienen una influencia significativa sobre la hidrólisis de la lactosa. Cabe indicar que para esto se calcularon los coeficientes de cada una de las variables puras y los coeficientes de sus interacciones.

Tabla 5.4: Matriz del modelo y porcentaje de hidrólisis

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	% Hidrólisis
1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	40.843
2	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	74.374
3	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	75.294
4	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	87.959
5	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	12.161
0	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	92.267
7	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	77.246
8	1	1	1	1	1	1	1	1	90.566
R1	1	0	0	0	0	0	0	0	85.396
R2	1	0	0	0	0	0	0	0	81.957
R3	1	0	0	0	0	0	0	0	95.271
R4	1	0	0	0	0	0	0	0	78.109
R5	1	0	0	0	0	0	0	0	68.618
R6	1	0	0	0	0	0	0	0	70.312

La regresión de mínimos cuadrados [22] proporcionó la información a cerca del error de los coeficientes a priori, es decir, de planificación experimental.

Tabla 5.5: Coeficientes de la regresión y error experimental

Coeficientes	b ₀	b ₁	b ₂	b ₃	b ₁₂	b ₁₃	b ₂₃	b ₁₂₃
	68.839	17.453	13.928	-0.779	-10.956	5.904	1.919	-5.740

Para determinar las variables relevantes para el estudio se realizó una comparación entre cada coeficiente obtenido y el error experimental.

Las replicas usadas para calcular el error expandido, fueron las correspondientes a los valores del porcentaje de hidrólisis de las muestras hidrolizadas, a partir de estas replicas se calcularon, otros parámetros indicados en la tabla 5.6.

Tabla 5.6: Parámetros para el cálculo del error expandido

Std = 9.931	alfa = 0.025
gl = 5	t _{student} = 3.1633
U _{expand} = 25.674	

Se observa que la variable X₁ y X₂ son significativas. Queda establecido el modelo de screening para el proceso de hidrólisis:

$$Y = 68.839 + 17.453X_1 + 13.928X_2$$

Para comprobar también se utilizó el método de Half Normal Plot. El Half Normal-Plot de los coeficientes estableció que no todas las variables estudiadas en el screening y sus interacciones son relevantes.

Tabla 5.7: Tabla para el Half-normal Plot

Coeficientes		Probabilidad
b ₃	0.78	7.14
b ₂₃	1.92	21.43
b ₁₂₃	5.74	35.71
b ₁₃	5.90	50.00
b ₁₂	10.96	64.29
b ₂	13.93	78.57
b ₁	17.45	92.86

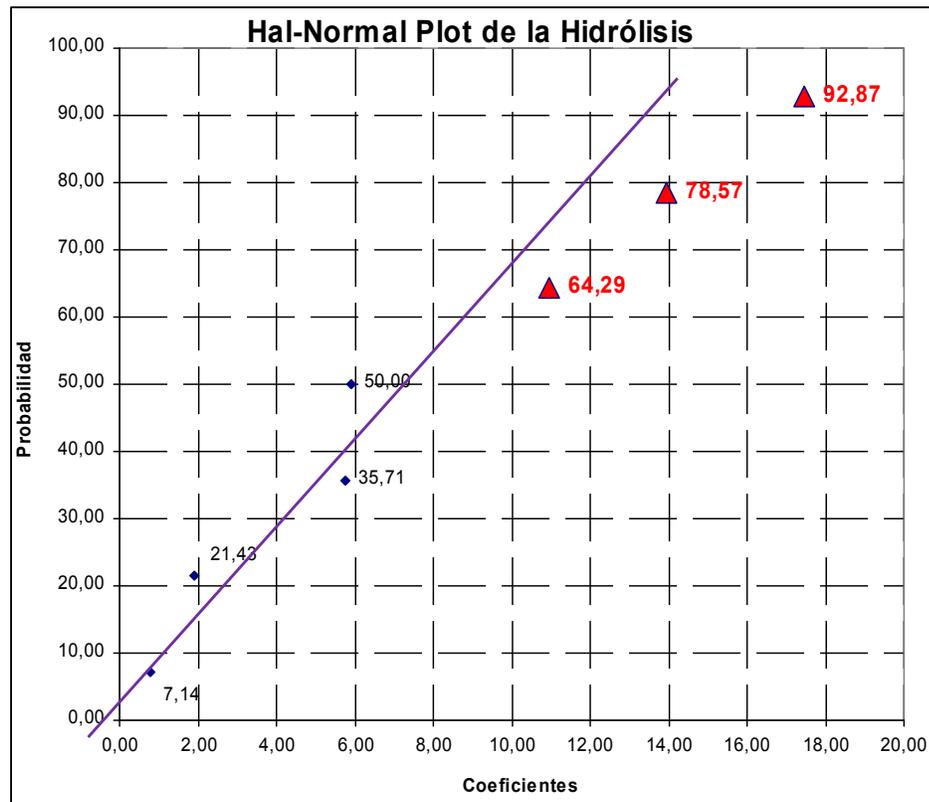


Gráfico 5.1: Half Normal-Plot de los coeficientes

Determinándose que las variables relevantes para el estudio son la cantidad de enzima y el tiempo de incubación, a medida de que se aumenta la cantidad de enzima el tiempo de incubación es menor [10]; con estas variables se realizó la optimización de la hidrólisis.

La optimización de la hidrólisis de la lactosa, se realizó considerando las dos variables antes mencionadas y se mantuvo la temperatura como un valor constante igual a 37°C, ya que esta corresponde a la temperatura óptima de actividad de la lactasa, la cual se desnaturalizándose por arriba de ésta temperatura. Sin embargo, la estabilidad se incrementa notablemente, entre 37 y 83 veces, en un rango de 60°C a 65°C cuando trabaja en leche, llegando a presentar una vida media de 146min a 60°C [14].

Optimización:

Para la optimización de la hidrólisis enzimática sobre la lactosa, se realizó experimentos simétricamente dispuestos con respecto a los ejes de los valores factoriales de distancia $\pm \alpha$ del centro; donde $\alpha = nf^{1/4}$

Los valores axiales son utilizados para estimar los coeficientes de los términos cuadráticos, por lo que los valores resultantes fueron $\pm 1,414$. Los mismos valores que están representados en la siguiente tabla con los respectivos valores para la experimentación.

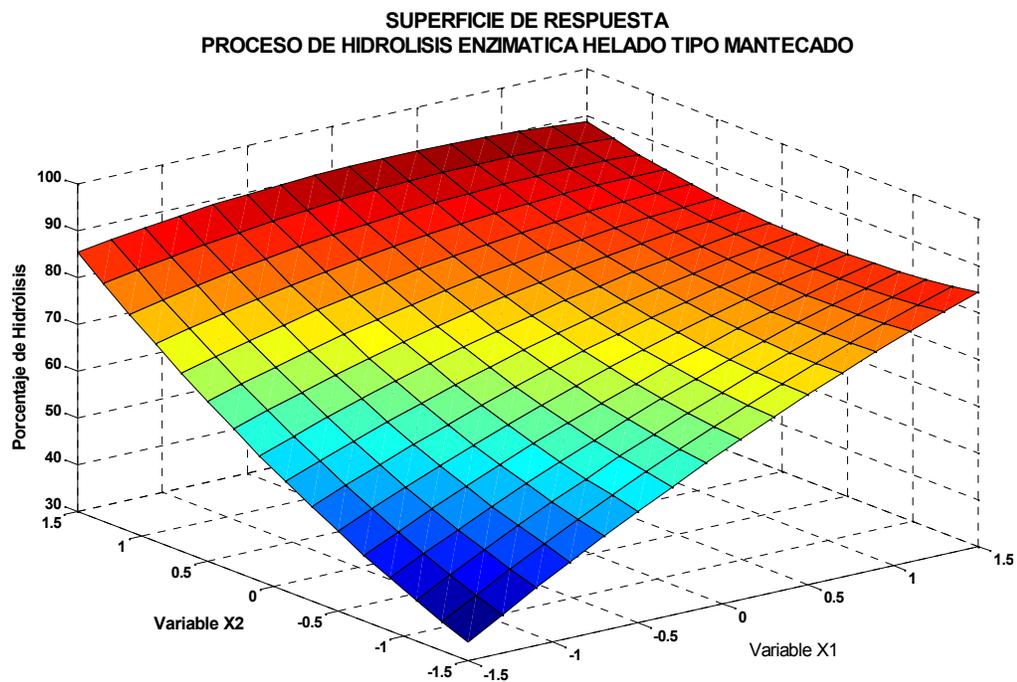
Tabla 5.8: Variables y condiciones experimentales para la optimización

ID	Variable	Unidad	Axial (-1.414)	Mínimo (-1)	Centro (0)	Máximo (+1)	Axial (1.414)
X ₁	Enzima	ml/lt	0.1586	0.2	0.3	0.4	0.4414
X ₂	Tiempo	min	70.32	120	240	360	409.86

Para la optimización se realizó un diseño experimental de 2², además se realizaron experimentos con los valores axiales y una repica adicional. Los valores obtenidos fueron:

Tabla 5.9: Resultados para optimización

Exp.	I	X_1	X_2	X_1X_2	X_1^2	X_2^2	% Hidrólisis
1	1	-1	-1	1	1	1	40.84
2	1	1	-1	-1	1	1	74.37
3	1	-1	1	-1	1	1	75.29
4	1	1	1	1	1	1	87.96
5	1	-1.414	0	0	1.999	0	62.91
6	1	1.414	0	0	1.999	0	80.89
7	1	0	-1.414	0	0	1.999	69.73
8	1	0	1.414	0	0	1.999	88.36
9	1	0	0	0	0	0	72.02

**Gráfico 5.2: Superficie de respuesta**

Se observa en la figura anterior que no existe evidencia clara de un punto de máximo absoluto, por lo cual se optó utilizar el método de la máxima pendiente, tomando como punto de partida el mejor experimento del diseño de superficie de respuesta, que corresponde al experimento número ocho.

Se realizó tres etapas sucesivas para optimizar la hidrólisis, cambiando únicamente el valor de k (longitud del paso de cada experimento)

Tabla 5.10: Porcentaje de hidrólisis a diferentes valores de k

	Escalado	Central	Coef.	k		Escalado	Real	% hidrólisis
X ₁	0	0.3	8.954	0.05	X1'	0.448	0.345	113.80
X ₂	1.414	240	9.299		X2'	1.879	465.476	

	Escalado	Central	Coef.	k		Escalado	Real	% hidrólisis
X ₁	0	0.3	8.954	0.025	X1'	0.224	0.322	104.55
X ₂	1.414	240	9.299		X2'	1.646	437.578	

	Escalado	Central	Coef.	k		Escalado	Real	% hidrólisis
X ₁	0	0.3	8.954	0.01	X1'	0.090	0.309	103.33
X ₂	1.414	240	9.299		X2'	1.507	420.839	

Con los resultados de la experimentación se determinó que el mayor grado de hidrólisis se obtiene con un $k = 0,01$. Luego se realizaron 5 réplicas adicionales en las mismas condiciones para obtener los límites de confianza.

Tabla 5.11: Porcentaje de hidrólisis en las mismas condiciones y con $k=0,01$

Exp	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C.medio	% Hidrólisis
Rp1	-0.7705	-0.7754	-0.7730	-0.7746	-0.7785	-0.7801	-0.7754	97.01
Rp2	-0.7841	-0.8039	-0.8001	-0.8032	-0.8045	-0.8020	-0.7996	106.19
Rp3	-0.7896	-0.7883	-0.7877	-0.7892	-0.7898	-0.7924	-0.7895	102.36
Rp4	-0.7627	-0.7584	-0.7605	-0.7601	-0.7581	-0.7637	-0.7606	91.43
Rp5	-0.7694	-0.7671	-0.7657	-0.7629	-0.7657	-0.7661	-0.7662	93.53

Tabla 5.12: Porcentaje de hidrólisis obtenido

Promedio	Desv.est.	Gl.	Prob.	t student.	Error exp.	L. inf.	L. sup.
98.10	6.12	4.00	0.025	3.495	9.57	88.53	107.68

El promedio de hidrólisis obtenido fue 98,10%; este valor resultante se considera alto y en función de este se calculó el error experimental, y con ello se determinó el menor y mayor grado de hidrólisis que se pueden obtener, obteniendo como resultado de la optimización de la hidrólisis, un valor de 88,53%.

5.2. Etapa 2: Optimización del proceso y producto

En la segunda etapa del estudio correspondiente a la optimización del proceso y producto, se aplicó un diseño de mezclas con variables de proceso. Las variables consideradas para el diseño de mezclas fueron tres: cantidad de pre-mezcla A',

cantidad de pre-mezcla B' y cantidad de pre-mezcla C'; cada pre-mezcla realizada contenía porcentajes diferentes de componentes puros, es decir de base hidrolizada, materia grasa y azúcar. Por otra parte las variables de proceso que se consideraron fueron dos: tiempo de maduración de la mezcla y tiempo de batido de la mezcla, es decir, el modelo para el estudio fue un diseño de mezclas de tres componentes con dos variables de proceso.

Tabla 5.13: Matriz de pre-mezclas

Matriz de pre-mezclas			
Componentes puros	A'	B'	C'
A	50%	25%	25%
B	25%	50%	25%
C	25%	25%	50%

Tabla 5.14: Componentes puros

Componentes puros		
ID	Variable	Unidad
A	Base hidrolizada	Kg
B	Materia Grasa	Kg
C	Azúcar	Kg

Tabla 5.15: Variables de proceso

Variables de proceso			
Variable	Unidad	Mínimo (-1)	Máximo (+1)
Tiempo maduración	horas	24	72
Tiempo batido	min	15	20

Con las variables mencionadas se realizó un diseño experimental de dos niveles, 2^2 , para las variables de proceso, y el diseño de mezclas se ajustó a un modelo cuadrático, que arrojó como resultado siete experimentos para cada uno de los niveles del diseño experimental, es decir, el primer nivel correspondía a los valores mínimos de tiempo de maduración y tiempo de batido; el segundo nivel, tenía el valor máximo de batido y el valor mínimo de tiempo de maduración; al tercer nivel, correspondían el mínimo tiempo de batido y el máximo tiempo de maduración; y finalmente el cuarto nivel, poseía los valores máximos para el tiempo de maduración y batido. Además se realizó una réplica para cada nivel con los valores centrales.

Tabla 5.16: Matriz de variables de proceso y mezclas

Matriz de variables de proceso y mezclas					
Variables de proceso		Mezclas			
Tiempo batido	Tiempo mad.	A'	B'	C'	Experimento
-1	-1	1	0	0	1A
		0	1	0	2A
		0	0	1	3A
		0.5	0.5	0	4A
		0	0.5	0.5	5A
		0.5	0	0.5	6A
		0.3	0.3	0.3	7A
		0.3	0.3	0.3	8A
1	-1	1	0	0	1B
		0	1	0	2B
		0	0	1	3B
		0.5	0.5	0	4B
		0	0.5	0.5	5B
		0.5	0	0.5	6B
		0.3	0.3	0.3	7B
		0.3	0.3	0.3	8B
-1	1	1	0	0	1C
		0	1	0	2C
		0	0	1	3C
		0.5	0.5	0	4C
		0	0.5	0.5	5C
		0.5	0	0.5	6C
		0.3	0.3	0.3	7C
		0.3	0.3	0.3	8C
1	1	1	0	0	1D
		0	1	0	2D
		0	0	1	3D
		0.5	0.5	0	4D
		0	0.5	0.5	5D
		0.5	0	0.5	6D
		0.3	0.3	0.3	7D
		0.3	0.3	0.3	8D

Teniendo como referencia la fórmula del helado, de la empresa Dulce Compañía CIA. Ltda., se desarrollo una nueva formulación en la que se modificaron algunos componentes. Las cantidades de leche común, leche evaporada y agua, fueron reemplazadas por base hidrolizada.

En la fórmula modificada, la mezcla de los tres componentes: base hidrolizada, materia grasa y azúcar se denominó “pre-mezcla”. Las cantidades de pre-mezcla A', pre-mezcla B' y pre-mezcla C', se colocaron de acuerdo a los requerimientos de cada experimento. Valores de componentes como: leche en polvo, vainilla y base 50, se mantuvieron constantes.

Tabla 5.17: Formulación del experimento 1A

Experimento 1A	
Componente	Cantidad (g)
Premezcla A'	4920
Leche en polvo	600
Vainilla	100
Base 50	150

Tabla 5.18: Formulación del experimento 4B

Experimento 4B	
Componente	Cantidad (g)
Premezcla A'	2460
Premezcla B'	2460
Leche en polvo	600
Vainilla	100
Base 50	150

Tabla 5.19: Formulación del experimento 8C

Experimento 8C	
Componente	Cantidad (g)
Premezcla A'	1640
Premezcla B'	1640
Premezcla C'	1640
Leche en polvo	600
Vainilla	100
Base 50	150

El número de experimentos desarrollados fueron un total de 32; cada experimento fue evaluado por un panel fijo de catadores semi-entrenados, conformado por 30 personas, hombres y mujeres entre 20 y 35 años, correspondientes a alumnos y personal de laboratorio de la Escuela de Ingeniería en Alimentos, de la facultad de Ciencia y Tecnología de la Universidad del Azuay. La evaluación se realizó mediante una ficha de catación, que contemplaba los aspectos más relevantes e influyentes en la estructura del helado, como son textura, aroma, sabor,

homogeneidad (referencia de norma argentina para helado). A estas personas se les explicó el formato de la hoja de catación y la forma en la se iba a llevar a cabo la catación con diferentes experimentos realizados al azar de la matriz de la tabla 5.16. La selección de los experimentos a ser catados se realizo aleatoriamente y se evaluaron 2 muestras por día.

A continuación se indica la ficha de catación utilizada:



UNIVERSIDAD DEL AZUAY
Facultad de Ciencia y Tecnología
Escuela de Ingeniería en Alimentos.

Ficha de cata de helado

Nombre:

Muestra:

Instrucciones: Al tomar la muestra de helado hay que evitar que la cuchara entre en contacto con el paladar, se recomienda catar con la cuchara al revés. A continuación se debe hacer que el helado recorra toda la boca e incluso los labios. Se debe descartar la primera muestra y después tomar otra que será la que se ingerirá, y se percibirá el retrogusto que el helado catado ofrece.

Homogeneidad: Uniformidad en la estructura del helado.	1. No hay homogeneidad	1	2	3
	2. Poco homogénea			
	3. Homogénea			

Color: La muestra que color presenta.	Blanco		Intensidad del color				
	Crema		1	2	3	4	5
	Amarillo						

Textura en el paladar:	1. Suave y cremosa	1	2	3
	2. Suave y arenosa			
	3. Dura y arenosa			

Aroma: Olor de la muestra. Se considerara 1 como el valor mínimo o ausencia del atributo y 5 como el valor máximo.	A leche	1	2	3	4	5
	A grasa					
	Vainilla					
	Ácido					
	Rancio					

Sabor: Sensación que el helado deja en el paladar. Se considerara 1 como el valor mínimo o ausencia del atributo y 5 como el valor máximo.	A grasa	1	2	3	4	5
	A leche					
	Vainilla					
	A metal					
	Rancio					

Dulzor:	1. Insípido	1	2	3	4	5
	2. Poco dulce					
	3. Normal					
	4. Dulce					
	5. Muy dulce					

Fusion: Presencia de agua en el helado.	1. Poco	1	2	3
	2. Nada			
	3. Mucho			

Evaluación global del helado: Impresión final del helado.	1. Mala	1	2	3	4	5
	2. Regular					
	3. Buena					
	4. Muy buena					
	5. Excelente					

Una vez que se realizaron todas las evaluaciones sensoriales, se efectuaron los respectivos cálculos para evaluar y validar la información obtenida.

Cada muestra tenía dieciocho variables respuesta a ser evaluadas (homogeneidad, color, textura, aroma, sabor, dulzor, fusión, evaluación global), y en cada una se tuvo 30 respuestas valoradas. Se trabajó con la mediana de las puntuaciones de cada atributo, para cada experimento desarrollado. A partir de las medianas calculadas se determinó la función de utilidad mediante el programa DART (Decisión Análisis by Ranking Techniques) [31].

La selección para la modulación mediante funciones de utilidad parcial para cada atributo sensorial se las escogió de manera lógica a las características que debe presentar el helado. Es decir una función lineal, para aquellas variables que se deseaba obtener la puntuación máxima; una función normal para valores centrales y una función inversamente logarítmica para aquellas que convenía tener el valor mínimo. Además de considerar los atributos evaluados, en la ficha de catación, se tomaron en cuenta los costos de producción y el rendimiento.

Obsérvese los datos en la siguiente tabla:

Tabla 5.20: DART

Variables	Transform	Optima	Weight	Lim. Inf.	Lim. Sup.
Homogeneidad	Lineal	Alto	0.050	2.000	3.000
C. blanco	Normal	0.500	0.050	0.000	1.000
C. crema	Normal	1.500	0.050	0.000	3.000
C. amarillo	Normal	1.000	0.050	0.000	2.000
Textura	Inv. Log.	Bajo	0.050	1.000	2.000
A. leche	Lineal	Alto	0.050	2.000	3.000
A. grasa	Normal	1.500	0.050	1.000	2.000
A. vainilla	Lineal	Alto	0.050	2.000	3.000
A. ácido	Lineal	Nada	0.050	1.000	1.000
A. rancio	Lineal	Nada	0.050	1.000	1.000
S. grasa	Inv. Log.	Bajo	0.050	1.000	2.000
S. leche	Normal	2.500	0.050	2.000	3.000
S. vainilla	Lineal	Alto	0.050	3.000	3.500
S. metal	Lineal	Nada	0.050	1.000	1.000
S. rancio	Lineal	Nada	0.050	1.000	1.000
Dulzor	Normal	4.000	0.050	3.000	5.000
Fusión	Normal	1.500	0.050	1.000	2.000
E. global	Lineal	Alto	0.050	2.000	4.000
Costos	Inv. Log.	Bajo	0.050	7.060	15.250
Rend. (%Vol)	Lineal	Alto	0.050	0.000	18.420

Una vez obtenidas las funciones de utilidad para cada experimento, se determinó el experimento que tenía el valor más alto de función de utilidad, que correspondía al experimento que mejor se ajusta al modelo propuesto.

Tabla 5.21: Funciones de utilidad

No	Exp	X1	X2	A'	B'	C'	F.U.
1	1A	-1	-1	1	0	0	0.351
2	2A	-1	-1	0	1	0	0.254
3	3A	-1	-1	0	0	1	0.324
4	4A	-1	-1	0.5	0.5	0	0.435
5	5A	-1	-1	0	0.5	0.5	0.360
6	6A	-1	-1	0.5	0	0.5	0.404
7	7A	-1	-1	0.3	0.3	0.3	0.515
8	8A	-1	-1	0.3	0.3	0.3	0.452
9	1B	1	-1	1	0	0	0.322
10	2B	1	-1	0	1	0	0.238
11	3B	1	-1	0	0	1	0.139
12	4B	1	-1	0.5	0.5	0	0.342
13	5B	1	-1	0	0.5	0.5	0.360
14	6B	1	-1	0.5	0	0.5	0.315
15	7B	1	-1	0.3	0.3	0.3	0.395
16	8B	1	-1	0.3	0.3	0.3	0.421
17	1C	-1	1	1	0	0	0.380
18	2C	-1	1	0	1	0	0.350
19	3C	-1	1	0	0	1	0.371
20	4C	-1	1	0.5	0.5	0	0.391
21	5C	-1	1	0	0.5	0.5	0.267
22	6C	-1	1	0.5	0	0.5	0.248
23	7C	-1	1	0.3	0.3	0.3	0.376
24	8C	-1	1	0.3	0.3	0.3	0.408
25	1D	1	1	1	0	0	0.473
26	2D	1	1	0	1	0	0.321
27	3D	1	1	0	0	1	0.358
28	4D	1	1	0.5	0.5	0	0.454
29	5D	1	1	0	0.5	0.5	0.329
30	6D	1	1	0.5	0	0.5	0.315
31	7D	1	1	0.3	0.3	0.3	0.475
32	8D	1	1	0.3	0.3	0.3	0.475

Se realizó el cálculo de los coeficientes estimados de regresión para las funciones de utilidad y se obtuvieron los gráficos correspondientes.

Tabla 5.22: Regresión para las mezclas

Regression for Mixtures: fu versus A, B, C, X1, X2					
Estimated Regression Coefficients for fu (component proportions)					
Term	Coef SE	Coef	T	P	VIF
A	0.3767	0.04516	*	*	1.599
B	0.3069	0.04516	*	*	1.599
C	0.2932	0.04516	*	*	1.599
A*B	0.1888	0.20757	0.91	0.414	1.599
A*C	0.0193	0.20757	0.09	0.93	1.599
A*X1	0.1928	0.20757	0.93	0.405	1.599
B*X1	0.0159	0.04516	0.35	0.743	1.599
C*X1	0.0096	0.04516	0.21	0.842	1.599
A*B*X1	-0.0496	0.04516	-1.10	0.033	1.599
A*C*X1	0.0640	0.20757	0.31	0.773	1.599
B*C*X1	0.0475	0.20757	0.23	0.83	1.599
A*C*X1	0.1440	0.20757	0.69	0.526	1.599
A*X2	0.0394	0.04516	0.87	0.432	1.599
B*X2	0.0181	0.04516	0.40	0.709	1.599
C*X2	0.0609	0.04516	1.35	0.249	1.599
A*B*X2	-0.1000	0.20757	-0.48	0.655	1.599
A*C*X2	-0.2665	0.20757	-1.28	0.268	1.599
B*C*X2	-0.1920	0.20757	-0.93	0.407	1.599
A*X1*X2	0.0332	0.04516	0.74	0.503	1.599
B*X1*X2	-0.0215	0.04516	-0.48	0.658	1.599
C*X1*X2	0.0457	0.04516	1.01	0.369	1.599
A*B*X1*X2	0.2320	0.20757	1.12	0.326	1.599
A*C*X1*X2	-0.0455	0.20757	-0.22	0.837	1.599
B*C*X1*X2	-0.0300	0.20757	-0.14	0.892	1.599

* NOTE * Coefficients are calculated for coded process variables.

S = 0.0906548 PRESS = 13.8849

R-Sq = 77.56% R-Sq(adj) = 0.00% R-Sq(pred) = 0.00%

Tabla 5.23: Análisis de variables para fu

Analysis of Variance for fu (component proportions)						
Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	23	0.113597	0.1136	0.00494	0.6	0.81
Component Only						
Linear	2	0.017656	0.01604	0.00802	1	0.45
Quadratic	3	0.013281	0.01328	0.00443	0.5	0.68
Component* X1						
Linear	3	0.012452	0.01125	0.00375	0.5	0.73
Quadratic	3	0.004868	0.00487	0.00162	0.2	0.89
Component* X2						
Linear	3	0.004876	0.02278	0.00759	0.9	0.51
Quadratic	3	0.020944	0.02094	0.00698	0.9	0.54
Component* X1 * X2						
Linear	3	0.028368	0.01473	0.00491	0.6	0.65
Quadratic	3	0.011151	0.01115	0.00372	0.5	0.73
Residual Error	4	0.032873	0.03287	0.00822		
Total	27	0.14647				

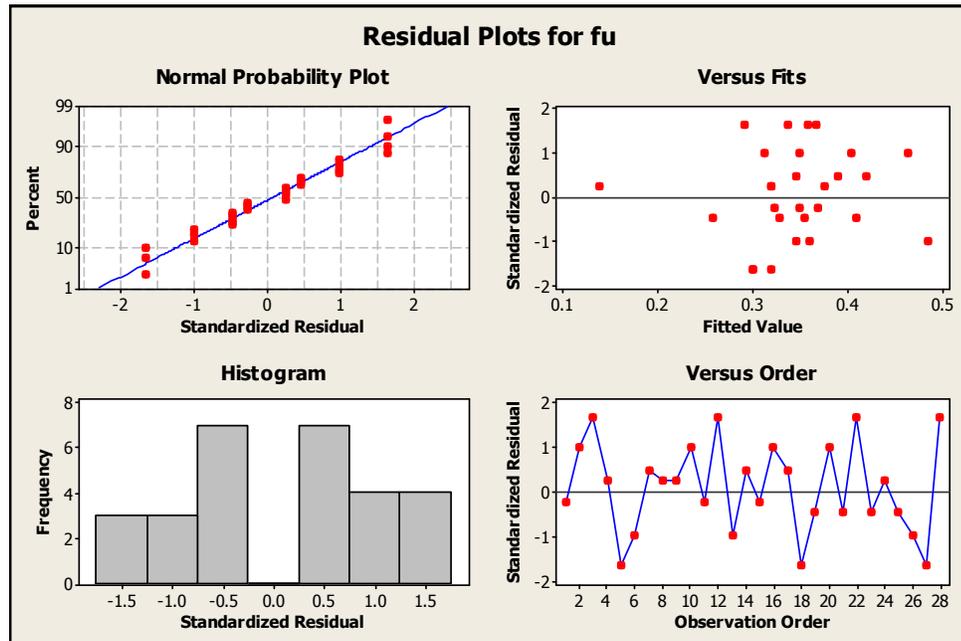


Gráfico 5.3: Gráfico de residuos

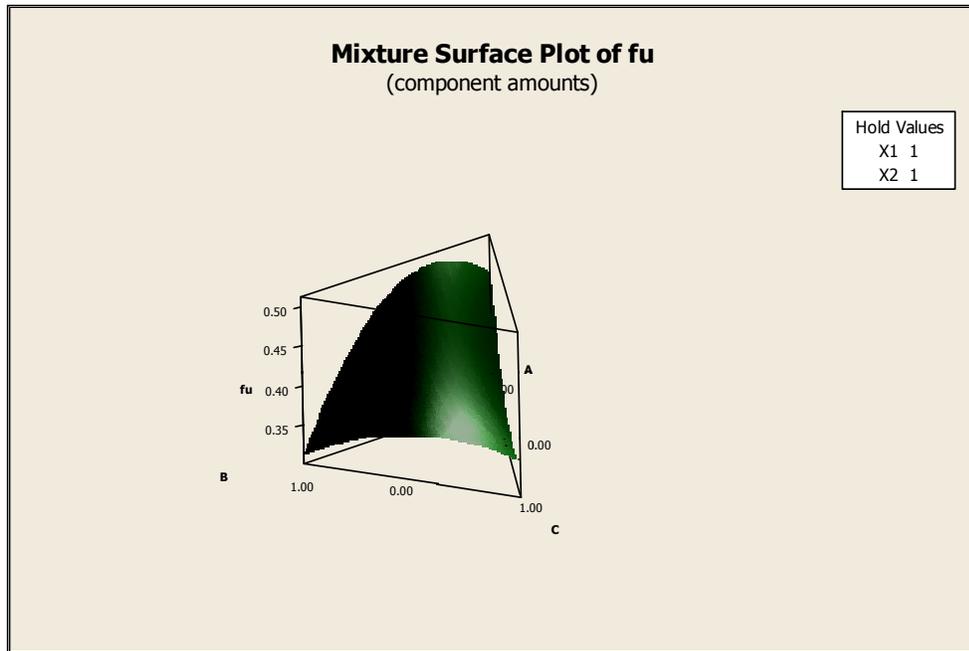


Gráfico 5.4: Mezcla de componentes

Mediante el gráfico se determinó que la mejor superficie de respuesta se encuentra en X_1 igual a 1 y X_2 igual a 1, además indicaron que la mezcla de componentes A' y B' son relevantes para el estudio, mientras que C', casi no es significativa.

Las respuestas obtenidas permitieron determinar las condiciones óptimas para la nueva formulación: las cuales fueron mayor tiempo de maduración y mayor tiempo de batido; las cantidades de pre-mezclas óptimas fueron 70% de pre-mezcla A, 20% de pre-mezcla B y 10% de pre-mezcla C.

Tabla 5.24: Matriz de optimización

Matriz de optimización					
Variables de proceso		Mezclas			
Tiempo batido	Tiempo mad.	A'	B'	C'	Experimento
1.5	1.5	0.7	0.2	0.1	E
		0.7	0.2	0.1	F
		0.7	0.2	0.1	G
		0.7	0.2	0.1	H

Bajo estas condiciones se realizaron cuatro experimentos, los cuales también fueron evaluados por el panel de catadores.

Con los resultados obtenidos de las medianas de los cuatro experimentos desarrollados, se realizó una comparación con las medianas de los experimentos anteriores, la formulación optimizada dio como respuesta una función de utilidad de 0.449, siendo el valor más alto; lo que nos indica que la nueva formulación optimizada fue del gusto y aceptación del panel de catadores.

La formulación final del helado se indica a continuación en la siguiente tabla:

Tabla 5.25: Fórmula final del helado

Fórmula final	
Componente	Porcentaje
Base hidrolizada	38%
Materia grasa	30%
Azúcar	22%
Leche en polvo	8%
Vainilla	1%
Base 50	1%

Las condiciones óptimas para las variables de proceso fueron: tiempo de maduración de la mezcla 76 horas y tiempo de batido de la mezcla 22 minutos.

La formulación obtenida es una alternativa para la elaboración de este tipo de productos a nivel industrial, ya que el riesgo de formación de cristales al bajar la temperatura por la presencia de lactosa es menor en comparación a la formulación original de la empresa.

El balance de la formulación final del helado cumple con los parámetros perceptibles al gusto del consumidor como son: poder anticongelante, extracto seco, dulzor y materia grasa. El helado elaborado tiene como componentes mayoritarios leche (base hidrolizada) y materia grasa de la misma, estos componentes brindan al producto las características propias de helado tipo mantecado. Los helados fabricados a nivel local, son elaborados principalmente a base de materia grasa vegetal, ya que su costo es relativamente bajo y por las facilidades tecnológicas ofrecidas, pues no requieren de un proceso previo, son

utilizadas directamente en la mezcla, sin embargo este tipo de producto no ofrece las características sensoriales que el consumidor espera.

CONCLUSIONES

Mediante la aplicación de diseño experimental y diseño de mezclas con variables de proceso, se pudo mejorar las características sensoriales y tecnológicas del helado tipo mantecado que comercializa la empresa Dulce Compañía Cía. Lda. La formulación obtenida fue la óptima y cumplió con las características deseadas por la empresa.

En la primera etapa del estudio, denominada hidrólisis enzimática, se logró obtener el mayor grado de hidrólisis sobre la lactosa de la leche, cumpliéndose de esta manera el objetivo planteado en esta etapa:

En la segunda etapa, se utilizó un diseño de mezclas con variables de proceso, para determinar el producto con las mejores características sensoriales y tecnológicas, mayor rendimiento y menor costo. Se estableció que el mejor helado está compuesto por: 38% de base hidrolizada, 30% de materia grasa, 22% de azúcar y 10% de otros componentes (leche en polvo, vainilla y base 50); mientras que para las variables del proceso las condiciones óptimas fueron: tiempo de maduración de la mezcla 70 horas y tiempo de batido de la mezcla 20 minutos.

La utilización del diseño experimental en el estudio de productos nuevos permite obtener resultados confiables y repetibles, basados en una experimentación planificada y no casual. La aplicación de estrategias experimentales, permitieron identificar y controlar variables relevantes para el estudio y optimización del producto.

Para el estudio y optimización de un alimento, se demuestra que es fundamental que el desarrollo experimental sea guiado por una planificación o diseño experimental, y que los datos obtenidos sean procesados de tal manera que se consideren todas las características del problema.

BIBLIOGRAFÍA

Referencias bibliográficas

ÁLVAREZ, H. SALAMANCA, G. 2007. Valoración metodología para el estudio de mezclas ternarias en sistemas alimentarios. *Alimentos Ciencia e Ingeniería*. Vol. 16(1): 92-96. Universidad Técnica de Ambato. Ecuador. [34]

BADUI DERGAL, Salvador. 1993. “Química de alimentos”. Editores. S.A De C.V. México, D.F. [5].

BOX, G., HUNTER, W. and HUNTES S. 1978. *Statistics for experimenters. An introduction to design, data analysis, and model building*. Editorial John Wiley & Sons. USA. [24]

BRAVERMAN, J.B.S. 1980. “Introducción a la bioquímica de los alimentos”. Editorial El Manual Moderno S.A. México. [10]

CARLSON, R. 1992. *Design and optimization in organic synthesis*. Editorial Elsevier Science Publishers B.V. Netherlands. [20]

CHACCHI, K. Mayo 2008. Curso teórico práctico “Elaboración de yogurt y helados”. Universidad Nacional Agraria La Molina. Editorial Publigraf. Ayacucho - Perú.

CORNELL, Jhon A. 1990. *Experiments with mixtures*. Second edition. Editorial Jhon Wiley and Sons, Inc. USA. [35]

CUATRECASAS, L. 2001. Gestión integral de la calidad: Implantación, control y certificación. Ediciones Gestión 2000, S.A. México. [17]

DRAPER, NR. and SMITH, H. 1981. *Applied regression analysis*. Editorial John Wiley & Sons, In. USA. [22]

FERNANDEZ, E.; FERNANDEZ, M.; PEREZ, I. 2008. Diseño de experimentos en tecnología y control de los medicamentos. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. Vol 39(2):28. Editorial ISSN. México. **[37]**

GABRIELSSON, J., LIND, NO. and LUNDSTEDT, T. 2002. *Multivariate Methods in Pharmaceutical Applications*. Editorial J. Chemometrics. USA 16: 141-160. **[26]**

GUTIÉRREZ, H. y DE LA VARA, R. 2008. Análisis y diseño de experimentos. Editorial McGraw-Hill. México. **[18]**

HUBERT. Richard, SCRIBAN, René 1984. Enzimología y biocatálisis/Biotecnología. Editorial El Manual Moderno 2 ed. México. **[11]**

IDROVO, A. PALACIOS, A. 2004. Utilización de diseño experimental de mezclas para la formulación y optimización de cóctel de frutas tropicales. Director: Dr. Piero Tripaldi. Universidad el Azuay, Facultad de Ciencia y Tecnología, Escuela de Ingeniería en Alimentos. Ecuador. **[28]**

INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACION. Helados. Requisitos. NTE INEN 706:2005. Ecuador. INEN, 2005. **[1]**

INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACION. Leche cruda. Requisitos. NTE INEN 9:2003. **[30]**

KIRK, R., SAWYER, R., EGAN, H. 1999. Composición y análisis de alimentos de Pearson. Editorial Continental S.A. Primera pre-impresión. México. Pág: 202, 213, 214, 219. **[32]**

LARRAÑAGA, I. 1999. Control e higiene de los alimentos. Editorial Cobra S.L. Madrid. Capítulo 12: 280 **[6]**.

LESS, R. 1982. Análisis de los alimentos. “Métodos analíticos y control de calidad”. Segunda edición. Editorial Acribia S.A. España.

LEWIS, GA., MATHIEU, D. and PHAN-TAN-LUU, R. 1999. *Pharmaceutical experimental design*. Editorial Marcel Dekker Inc. USA. **[21]**

LUNDSTEDT, T., SEIFERT, E., ABRAMO, L., THELIN, B., NYSTRÖM, Å., PETERSEN, J. and BERGMAN, R. 1998. *Experimental design and optimization*. Editorial *Chemometr. Intel. Lab. Syst.* Netherlands, 42: 3-40. [27]

MADRID, Vicente. 1996. Curso de industrias lácteas. Primera Edición. Editorial Acribia S.A. Madrid, España. Capítulo X: 291,292 [4].

MASSART, DL., VANDEGINSTE, BGM. and BUYDENS, LMC. 1997. *Handbook of chemometrics and qualimetrics: Part A*. Editorial Elsevier Science B.V. Netherlands. [23]

MOGROVEJO, K. URGILÉS, G. 2010. "Optimización de las condiciones de hidrólisis utilizando β -galactosidasa inmovilizada por atrapamiento y determinación de lactosa residual.". Director: Ing. Claudio Sánchez. Universidad del Azuay, Facultad de Ciencia y Tecnología, Escuela de Ingeniería en Alimentos. Ecuador. [15]

MONTGOMERY, DC. 2001. *Design and analysis of experiments*. Fifth edition. Editorial John Wiley & Sons. USA. [25]

MURPHY, M., MUSET, G., RODRIGUEZ, G. 2002. Aplicación de la crioscopia a la medición de la hidrólisis enzimática de la lactosa. 4º Jornadas de Desarrollo e Innovación, Universidad de Palermo. Noviembre 2002. Argentina. Vol. 2: 32. [16]

PAVAN, M. 2003. "*Total and partial ranking methods in chemical sciences*". Ph.D.thesis in chemical sciences. Editorial Talete S.r.l. Italy. [29]

PEARSON, D. 1986. Técnicas de laboratorio para el análisis de alimentos. Editorial Acribia S.A. España. [33]

ROBINSON, D. 1991. Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos. Editorial Acribia S.A. España. Pag.22. [13]

ROBINSON R.K. 1987. Microbiología lactológica. Vol II."Microbiología de los productos lácteos". Editorial Acribia S.A. España. Pag.5-7. [2]

SÁNCHEZ, C. URGILÉS, G. VERDUGO, P. LAZO, J. ROJAS, C. 2007. Estudio Tecnológico de Variables de Proceso Mediante Diseño Experimental y Función de Dominancia Para Evaluar La Calidad Sensorial del Manjar de Leche con Hidrólisis Enzimática. *Alimentos Ciencia e Ingeniería*. Ecuador. Vol. 16(3): 318-320

SCRIBAN, René. 1984. Producción de enzimas/ Biotecnología. Editorial El Manual Moderno. Segunda edición. México. Pag. 282-297. [9]

TALETE Srl. 2007. *DART-Decisión Análisis by Ranking Techniques* (Version 2.0). [31]

TODESCHINI, R., BALLABIO, D., CONSONNI, V., MAURI, A. e PAVAN, M. 2006. *La metodología della ricerca sperimentale*. Editorial Milano Chemometrics and Research Group. Italy. [19]

WARD, Owen P. 1991. Biotecnología de la fermentación. Editorial Acribia S.A. Zaragoza. Capitulo XII: 274. [12]

Referencias electrónicas

BARRETA, Tomas. 2009. Escuela de vitivinicultura. [en línea] Disponible en web: <http://www.utu.edu.uy/Escuelas/departamentos/canelones/vitivinicultura/Bioquimica%20Enologica/Teoricos/Enzimas.pdf>. Argentina. [7]

CARRERA, Eliecer. 2010. Modelo de ajuste inducido [en línea] 2010. Disponible en web: <http://www.itescam.edu.mx/principal/sylabus/fpdb/recursos/r52038.PDF>. México.

CARRERA, Eliecer. 2010. Modelo de la llave y la cerradura [en línea]. Disponible en web: <http://www.itescam.edu.mx/principal/sylabus/fpdb/recursos/r52038.PDF>. México.

CORVITTO, Angelo. 2004 Los secretos del helado [en línea]. Disponible en web: <http://librosdigitalesfree.blogspot.com/search?q=los+secretos+del+helado>. España. [3]

DI BARTOLO, Eduardo. 2005. Guía para la elaboración de helados. [en línea]. Disponible en web: <http://www.alimentosargentinos.gov.ar/recetas-guiaparalaelaboraciondehelados> (visitado en octubre 2009). Argentina.

DIEDRICH, Dirlei. 2002. Enzimas. Director: Dr. Agenor Furigo Junios. Universidad Federal de Santa Catarina. Centro tecnológico. Departamento de Ingeniería química e ingeniería de alimentos. Brasil – Florianópolis. Disponible en web: http://www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc_eng_bioq/lista_exerc/enzimas_aspectos_ge_rais.pdf. Brasil.

DIRECTINDUSTRY 2010. Dosificadora de Polvos [en línea]. Disponible en web: <http://www.directindustry.es/prod/sulzer-metco/sistema-de-dosificacion-de-polvo-23581-3Dalimentador%2Bde%2Bpovos%26um%3D1%26hl%3Des%26tbs%3Disch:1>. Ecuador.

DIRECTINDUSTRY 2010. Bomba de émbolo [en línea]. Disponible en web: <http://www.directindustry.es/prod/woma/bomba-de-embolo-a-alta-presion-para-agua-industrial-15514-34822.html>. Ecuador.

DIRECTINDUSTRY 2010. Bomba de lóbulos. [en línea]. Disponible en web: <http://www.directindustry.es/prod/apv/bomba-de-lobulos-higienica-5697-30167.html>. Ecuador.

EDUCASTUR 2010. Reacción de Fehling [en línea]. Disponible en web: http://web.educastur.princast.es/proyectos/biogeo_ov/2bch/B1_BIOQUIMICA/t13_GLUCIDOS/diapositivas. México.

INTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGÍA INDUSTRIAL. 2006 Dosificación de enzima [en línea]. <http://www.interenzimas.com/Interenzimas> (visitado en septiembre de 2007). México.

FRIGOMAT 2010. Mantecadora Vertical [en línea]. Disponible en web: http://www.frigomat.com/index.php?p=mantecatore-verticale-g60&main_exp=167&sub_exp=150. Italy.

FRIGOMAT 2010. Mantecedora horizontal [en línea]. Disponible en web: http://www.frigomat.com/index.php?p=mantecatore-orizzontali-g60&main_exp=167&sub_exp=150. Italy.

FRIGOMAT 2010. Pasteurizador. [en línea]. Disponible en web: http://www.frigomat.com/index.php?p=pastorizzatori-peb-lcd-60&main_exp=160&sub_exp=164. Italy

LABWAY 2010. Crioscopio. [en línea]. Disponible en web: www.labway.sk/CryoStar_Funke-Gerber. Alemania.

LOPEZ, Agustín., GARCÍA. Mariano. 2002. Biotecnología Alimentaria. [en línea] . Disponible en web: <http://books.google.com.ec/books?id=2ctdvBnTa18C&printsec=frontcover#v=onepage&q&f=false>. México. [14]

MODERNPACK 2010. Tanque mezclador [en línea]. Disponible en web: <http://spanish.alibaba.com/product-gs/mixer-tank-220120623.html>. España.

MUÑOZ, J. 2010. Estandarización de los procesos de producción de los productos elaborados para los puntos de venta de yogen FrÜz. Director: Ing. Carlos Eduardo Santos. Universidad de la Salle. Facultad de Ingeniería en Alimentos. Bogotá 2006. Disponible en web: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis139.pdf> (visitado el 8 enero de 2010). Colombia. [5]

MUTEKI, K., MACGREGOR, J, 2010 *Mixture designs and models for the simultaneous selection of ingredients and their ratios.* [en línea]. Disponible en web: www.elsevier.com/locate/chemolab. USA. [36]

Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB) Enzyme Nomenclature. 2009. Nomenclatura de las enzimas. [en línea]. Disponible en web: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/2/1/23.html> (visitado en noviembre 2009). Brasil. [8]

PRO-ANDEX ING.LTDA. 2010. Homogeneizador [en línea]. Disponible en web: http://maquinariayequipos.cl/?Remate_de_Equipos. Colombia.

ZACARÍA, Eduardo. 2007. Asociación Argentina de Ingenieros en la Industria Alimentaria. [en línea]. Disponible en web: <http://aaiia.ar.tripod.com/aaiia>. Argentina.

ANEXOS

CDU 637

INEN

AL 03.01-430

Norma
Ecuatoriana**HELADOS DE LECHE.
REQUISITOS.**

INEN 706

OBLIGATORIA**1. OBJETO**

1.1 Esta norma establece las características que deben cumplir los helados de leche.

2. TERMINOLOGIA

2.1 **Helado de leche.** Es el producto lácteo elaborado con mezclas de leche pasteurizada entera, semidescremada y descremada, leche condensada o evaporada; crema de leche, mantequilla, azúcar, aromatizantes, huevos, frutas, jugo de frutas y otros productos permitidos, sometido a un enfriamiento progresivo hasta la congelación adecuada.

3. CLASIFICACION

3.1 De acuerdo a su contenido de grasa, los helados se clasifican en los siguientes tipos:

- Tipo I. *Helado de crema.* El que contenga crema, leche, azúcar, vainilla, huevos y otros productos de uso permitido.
- Tipo II. *Helado de leche.* El que contenga leche, azúcar, vainilla, huevos; adicionado o no de nueces, castañas, avellanas molidas, una pequeña porción de coñac, ron o kirsch.
- Tipo III. *Helado de frutas.* El que contenga leche, jugos, néctares o jarabes naturales de las frutas y azúcar.

4. DESIGNACION

4.1 De acuerdo al producto que lo caracterice, el helado será designado por su nombre.

Ejemplo:

- helado de chocolate,
- helado de crema,
- helado de tomate.

5. REQUISITOS DEL PRODUCTO**5.1 Requisitos generales**

5.1.1 El helado debe presentar un aspecto de masa semidura o masa dura, con un olor y sabor propio.

(Continúa)

INEN 706

5.2 Requisitos de elaboración

5.2.1 El helado debe elaborarse con agua potable, leche, crema de leche, huevos frescos, frutas, almendras u otras semillas y, además, sustancias permitidas en buen estado de conservación. Los helados expuestos a la venta, con o sin palillo, deben estar perfectamente solidificados por el frío. Los helados que tengan en su composición huevos, deben tener mínimo cuatro huevos por kilo.

5.2.2 Los helados clasificados según el numeral 3, incisos b) y c), deben tener como mínimo el 60% de leche; los que tengan frutas o parte de frutas deben tener el 10% de éstas; los que tengan frutas secas, nueces, almendras, cacao o chocolate, deben tener como mínimo 5% de éstos; los que tengan ron, coñac, deberán contener los elementos correspondientes a su denominación.

5.3 Aditivos

5.3.1 Podrá agregarse al helado, como coloide protector para evitar la formación de cristales de hielo, espesantes de uso permitido, como gelatina, agar, alginatos o yema de huevo.

5.3.2 Los helados ensayados, de acuerdo con las normas ecuatorianas correspondientes, deberán cumplir con los requisitos generales establecidos en la Tabla 1.

TABLA 1. Requisitos generales del helado

REQUISITOS	TIPO I		TIPO II		TIPO III		METODO DE ENSAYO
	MIN. %	MAX. %	MIN. %	MAX. %	MIN. %	MAX. %	
Pérdida por calentamiento	68	—	72	—	70	—	INEN 164
Grasa de leche	8	—	6	—	3	—	INEN 012
Sólidos totales	32	—	28	—	30	—	INEN 014
Azúcares totales	13	—	13	—	13	—	INEN 398
Acidez *	—	0,20	—	0,20	—	0,20	INEN 013
Coolesterol	0,10	—	0,10	—	—	—	INEN 729

* Expresado en ácido láctico

5.3.3 Los tres tipos de helados, clasificados en el numeral 3, ensayados de acuerdo con las normas ecuatorianas correspondientes, deberán cumplir con los requisitos microbiológicos establecidos en la Tabla 2.

TABLA 2. Requisitos microbiológicos

REQUISITOS	TIPO I	TIPO II	TIPO III	METODO DE ENSAYO
	MAX/g	MAX/g	MAX/g	
Bacterias activas	30 000	30 000	30 000	INEN 170
Bacterias coliformes	5	5	5	INEN 171
Bacterias patógenas	neg	neg	neg	INEN 720
Hongos y levaduras	neg	neg	neg	INEN 172

(Continúa)

INEN 706

6. REQUISITOS COMPLEMENTARIOS

6.1 **Envasado.** El helado debe acondicionarse en envases cuyo material, en contacto con el producto, sea resistente a su acción y no altere las características organolépticas del mismo.

6.2 **Rotulado.** El rótulo o la etiqueta del envase debe incluir en caracteres legibles, la siguiente información:

- a) nombre del producto y el porcentaje de grasa,
- b) marca registrada,
- c) número de lote,
- d) razón social de la empresa fabricante,
- e) masa neta en gramos o kilogramos. Relación = $\frac{\text{volumen/litros}}{\text{masa en kilos}}$ no debe exceder de dos,
- f) fecha de fabricación y tiempo máximo de consumo,
- g) aditivos añadidos,
- h) número de Registro Sanitario y fecha de emisión,
- i) país y ciudad de origen,
- j) forma de conservación.

6.3 La comercialización de este producto cumplirá con lo dispuesto en las Regulaciones y Resoluciones dictadas, con sujeción a la Ley de Pesas y Medidas.

7. MUESTREO

7.1 El muestreo se realizará de acuerdo con la Norma INEN 004.

(Continúa)

INEN 706

APENDICE Z

Z.1 NORMAS A CONSULTAR

- INEN 003. *Leche y Productos Lácteos. Definiciones.*
- INEN 004. *Leche y Productos Lácteos. Muestreo.*
- INEN 012. *Leche y productos lácteos. Determinación del contenido de grasa.*
- INEN 013. *Leche y productos lácteos. Determinación de acidez titulable.*
- INEN 014. *Leche y productos lácteos. Determinación de sólidos totales y cenizas.*
- INEN 164. *Mantequilla. Determinación de pérdida por calentamiento.*
- INEN 170. *Mantequilla. Gérmenes comunes.*
- INEN 171. *Mantequilla. Contaje de bacterias coliformes.*
- INEN 172. *Mantequilla. Levadura y hongos.*
- INEN 398. *Conservas vegetales. Determinación de azúcares.*
- INEN 720. *Leche y productos lácteos. Determinación de bacterias patógenas.*
- INEN 729. *Leche y productos lácteos. Determinación del colesterol.*

Z.2 BASES DE ESTUDIO

- FAQ - Food and nutrition paper. Manuals of food quality control, 3 commodities. ICE cream. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Roma 1979.
- Normas Sanitarias de Alimentos OFSANPAN ALUTZ 029 - 09 - 00B. *Helados y sorbetes.* OPS/OMS Oficina Sanitaria Panamericana. Washington 1978.
- Code of Federal Regulations, 21 Food and drugs. *Ice cream office of Federal Register National Archives and Records Service General Administration.* Washington D.C. 1977.
- Aurelio Revilla. *Tecnología de la leche. Procedimiento, manufactura y análisis. Helados y sorbetes.* Centro Regional de ayuda técnica. México, 1969.
- Winton A.L. *Análisis de alimentos. Helado pp 946.* Editorial Hispano Americana. Barcelona, 1958.
- ICE Cream and cup cap. Simplified practice recommendation R 132 - 36 U.S. Department of commerce. United States Government printing office. Washington, 1936.

INEN 706

1983-06

INFORMACION COMPLEMENTARIA

La Norma INEN 706 fue sometida a Consulta Pública de 1982-03-15 a 1982-05-25 y se tomaron en cuenta todas las observaciones recibidas.

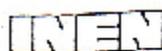
La norma en referencia fue estudiada por el Subcomité Técnico AL 03.01 LECHE Y PRODUCTOS LACTEOS y aprobada por éste en 1982-12-22.

Formaron parte del Subcomité Técnico las siguientes personas:

INTEGRANTES:	ORGANIZACION REPRESENTADA
Sr. Joffre Wirth Espinoza	AIPLE
Ing. Roberto Fiallos	UNIVERSIDAD TECNICA DE AMBATO
Dr. José Hanna	INDULAC – AIPLE
Dra. Teresa Avila	LABORATORIO MUNICIPAL DE HIGIENE
Ing. Nelson Jaramillo	INSOTEC
Ing. Patricio Lbpez	COMERCIAL DANESA
Dra. Yolanda de Fuentes	INLDECSA
Dra. Rosa de León	INSTITUTO IZQUIETA PEREZ (Quito)
Dra. Mónica Sosa de Galárraga	INSTITUTO IZQUIETA PEREZ (Quito)
Dr. Gustavo Guerra	MINISTERIO DE SALUD
Dra. Magdalena Batus	MINISTERIO DE SALUD
Dr. Alberto Proaño	MINISTERIO DE AGRICULTURA
Ing. Eduardo Iturralde	LA AVELINA
Dra. Leonor Orozco	INEN

Esta norma fue aprobada por el Consejo Directivo del Instituto Ecuatoriano de Normalización, INEN, en sesión de 1983-06-14.

El señor Ministro de Industrias, Comercio e Integración autorizó y oficializó esta norma con el carácter de OBLIGATORIA, mediante Acuerdo No. 441 de 1983-09-01, publicado en el Registro Oficial No. 579 de 1983-09-15.



INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN

Quito - Ecuador

NORMA TÉCNICA ECUATORIANA

NTE INEN 9:2003

Tercera revisión

LECHE CRUDA, REQUISITOS.

Primera Edición

RAW MILK SPECIFICATIONS

First Edition

DESCRIPTORES - Alimentos, productos lácteos, leche cruda, requisitos.
AL 03 01 401
CDU: 637.133.4
CIJ: 3112
ICS: 67.100.10

INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA

Documento: NTE INEN 9 Tercera revisión	TÍTULO: LECHE CRUDA. REQUISITOS	Código: AL 03.01-401
ORIGINAL: Fecha de iniciación del estudio:	REVISIÓN: Fecha de aprobación anterior por Consejo Directivo Oficialización con el Carácter de Obligatoria por Acuerdo No. 345 de 1987-05-14 publicado en el Registro Oficial No. 726 de 1987-07-10 Fecha de iniciación del estudio: 1999-10-08	
Fechas de consulta pública: de		a
Subcomité Técnico: LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS		
Fecha de iniciación: 1999-10-15		Fecha de aprobación: 1999-11-26
Integrantes del Subcomité Técnico:		
NOMBRES:	INSTITUCIÓN REPRESENTADA:	
Ing. Patricia Losada	FLORALP	
Dra. Luz Guerrero (Presidenta)	PASTEURIZADORA QUITO	
Ing. Miriam Guibor	CONSORCIO ALIMEC	
Dra. María Eugenia Espinoza	LECHERA ANDINA-LEANSA	
Dra. Amparo Fuentes	PARMALAT	
Ing. Héctor Benavides	PRODUCTOS EL KIOSCO-CAYAMBE	
Leda Luch Aillón Castilla	ASOCIACIÓN DE GANADEROS DE LA SIERRA Y AMAZONIA	
Dra. Teresa Ayala	DIRECCIÓN DE HIGIENE-MUNICIPIO DE QUITO	
Ing. José Ortiz	PROLACTEM-CUENCA	
Dr. Jorge Cobi Pearce	NESTLE ECUADOR	
Ing. Marcelo Miranda	DULA'S-CAYAMBE	
Dr. Raúl Valverde	PROLAC-RIOBAMBA	
Ing. María A. Valdovinoso	INDUSTRIAS LÁCTEAS TONI	
Ing. Hernán A. Torres	SESA-MAG	
Ing. Julio Gutiérrez Robles	CENTRO DE ADIESTRAMIENTO LECHERO	
Dra. Sandra Guaran	PRODUCTOS LÁCTEOS SAN ANTONIO	
Dra. Mónica Sosa de Galárraga	INSTITUTO NACIONAL DE HIGIENE LEOPOLDO IZQUIETA PEREZ-QUITO	
Dra. Gisela Landívar Vera	PRODUCTOS DEL KIOSKO	
Ing. Raquel Buitrón	INDUSTRIA LECHERA CARCHI	
Tigo. Patricia Aguilera	PRODUCTOS LÁCTEOS SAN ANTONIO	
Tigo. José Neñez	PASTEURIZADORA QUITO	
Ing. Martha Bahamón	PARMALAT	
Dr. Gustavo Risco Tapia	INDUSTRIAS LÁCTEAS TONI	
Ing. Marcelo Píncel Robles	CONSORCIO ALIMEC	
Ing. Jorge Arturo Gómez	NESTLE- ECUADOR	
Ing. Hernán Cortés	PARMALAT	
Dr. Hernán Rofrío	DIRECCIÓN DE HIGIENE MUNICIPAL	
Ing. Jorge Troya	ASOCIACIÓN DE GANADEROS DE LA SIERRA Y EL ORIENTE	
Dra. Magda Saltes	MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA	
Ing. Bolívar Cano (Secretario Técnico)	INEN	
Otras fuentes:		
El Consejo Directivo del INEN aprobó este proyecto de norma en sesión del 2002-10-22		
Oficializada como: Obligatoria	Por Acuerdo Ministerial No. 02 501 del 2002-12-26	
Registro Oficial No. 739 del 2003-01-07		

APÉNDICE Z

Z.1 DOCUMENTOS NORMATIVOS A CONSULTAR

- Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 4: 1984. *Leche y productos lácteos. Muestreo. Primera revisión.*
- Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 11: 1984. *Leche. Determinación de la densidad relativa. Primera revisión.*
- Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 12: 1973. *Leche. Determinación del contenido de grasa.*
- Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 13: 1984. *Leche. Determinación de la acidez titulable. Primera revisión.*
- Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 14: 1984. *Leche. Determinación de sólidos totales y cenizas. Primera revisión.*
- Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 15: 1973. *Leche. Determinación del punto de congelación.*
- Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 16: 1984. *Leche. Determinación de proteínas. Primera revisión.*
- Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 18: 1973. *Leche. Ensayos de reductasas.*
- Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1 500:2001. *Leche. Métodos de ensayo cualitativos para la determinación de la calidad.*
- AOAC 988.08 *Antimicrobial Drugs in Milk. Microbial Receptor Assay. First Action 1988.*
- Reglamento de leche y productos lácteos. Decreto Ejecutivo No. 2800 de 1984-08-01. Registro Oficial No. 802 de 1984-08-07

Z.2 BASES DE ESTUDIO

- Norma Venezolana COVENIN 903:93 (18). *Leche pasteurizada.* Comisión Venezolana de Normas Industriales. Caracas, 1989.
- Norma Técnica Colombiana NTC 506:93. *Productos Lácteos. Leche Entera Pasteurizada.* Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación ICONTEC. *Sistema de Normas Técnicas NTC 506:93*
- Association of Official Analytical Chemists *Official Methods of Analysis.*, 15th Edition., Vol. 2, 1990.

6. INSPECCIÓN

6.1 Muestreo. El muestreo debe realizarse de acuerdo con la NTE INEN 4.

TABLA 2. Clasificación de la leche cruda de acuerdo al TRAM o al contenido de microorganismos

Categoría	Tiempo de Reducción del Azul de Metileno (TRAM)	Contenido de microorganismos aerobios mesófilos HEP UFC/cm ³
A (buena)	Más de 5 horas *	Hasta 5×10^5
B (regular)	De 2 a 5 horas	Desde 5×10^5 , hasta $1,5 \times 10^6$
C (mala)	De 30 min a 2 horas	Desde $1,5 \times 10^5$, hasta 5×10^5
D (muy mala)	Menos de 30 min	Más de 5×10^5

* Puede deberse a la presencia de conservantes por lo que se recomienda su identificación según la NTE INEN 1500.

NTE INEN B

2003-01

TABLA 1. Requisitos físico-químicos de la leche cruda

REQUISITOS	UNIDAD	MIN.	MAX.	MÉTODO DE ENSAYO
Densidad relativa: a 15 °C	-	1,029	1,033	NTE INEN 11
a 20 °C	-	1,026	1,032	
Materia grasa	%(m/ml)	3,2	-	NTE INEN 12
Acidez titulable como ácido láctico	%(m/vl)	0,13	0,16	NTE INEN 13
Sólidos totales	%(m/m)	11,4	-	NTE INEN 14
Sólidos no grasos	%(m/ml)	8,2	-	-
Cenizas	%(m/m)	0,05	0,80	NTE INEN 14
Punto de congelación (punto crioscópico) **	°C °H	-0,536 -0,555	-0,512 -0,530	NTE INEN 15
Proteínas	%(m/m)	3,0	-	NTE INEN 16
Ensayo de reductasa (azul de metileno)	H	2	-	NTE INEN 1B
Reacción de estabilidad proteica (prueba de alcohol)	No se coagulará por la adición de un volumen igual de alcohol neutro de 65 % en peso o 75 % en volumen			NTE INEN 1 500
Presencia de conservantes ¹⁾	-	Negativo		NTE INEN 1500
Presencia de neutralizantes ²⁾	-	Negativo		
Presencia de adulterantes ³⁾	-	Negativo		
Antibióticos:				AOAC -988.08 16 Ed. Vol. 2
B-Lactámicos	µg/l	-	5	
Tetracíclicos	µg/l	-	100	
Sulfas	µg/l	-	100	

** Diferencia entre el contenido de sólidos totales y el contenido de materia grasa.

1) Conservantes: formaldehído, peróxido de hidrógeno, cloro, hipocloritos, cloraminas y dióxido de cloro.

2) Neutralizantes: sosa cáustica, carbonatos, hidróxido de sodio, jabones de baja calidad.

3) Adulterantes: Harina y amidosos, soluciones azucaradas o soluciones salinas, colorantes, leche en polvo, suero, grasas extrañas.

**°C = °H - f, donde f = 0,9658

5.4 Requisitos complementarios

5.4.1 El almacenamiento, envasado y transporte de la leche entera cruda debe realizarse de acuerdo a lo que señala el Reglamento de leche y productos lácteos.

(Continúa)

4.2 La leche cruda después del ordeño debe ser enfriada lo más pronto posible, almacenada y transportada hasta los centros de acopio y/o plantas procesadoras en recipientes apropiados autorizados por la autoridad sanitaria competente.

4.3 En los centros de acopio la leche cruda debe ser filtrada y enfriada con agitación constante hasta una temperatura no superior a 10°C.

5. REQUISITOS

La leche cruda debe cumplir con los siguientes requisitos:

5.1 Requisitos organolépticos (ver nota 1)

5.1.1 *Color.* Debe ser blanco opalescente o ligeramente amarillento

5.1.2 *Olor.* Debe ser suave, lácteo característico, libre de olores extraños.

5.1.3 *Aspecto.* Debe ser homogéneo, libre de materias extrañas

5.2 Requisitos físicos y químicos

5.2.1 La leche cruda, de acuerdo con las normas ecuatorianas correspondientes, debe cumplir con las especificaciones que se indican en la tabla 1.

5.3 Requisitos microbiológicos

5.3.1 Según el recuento estándar en placa $10^6/\text{cm}^3$ de microorganismos aerobios mesófilos, determinado de acuerdo a la NTE INEN 1529-5, la leche cruda se clasifica en cuatro categorías, según se indica en la tabla 2.

5.3.2 La validez de cualquiera de los requisitos de la tabla 2, está condicionada a la comprobación de sustancias conservantes o neutralizantes.

NOTA 1. Se podrán presentar variaciones en estas características, en función de la raza, estación climática o alimentación; pero estas no deberán afectar significativamente las características sensoriales indicadas.

(Continúa)