



UNIVERSIDAD DEL AZUAY
FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA
ESCUELA DE INGENIERÍA DE ALIMENTOS

“MÉTODOS DE DISEÑO EXPERIMENTAL FACTORIAL FRACCIONARIO
APLICADOS A LA ELABORACIÓN DE QUESO DE CABRA”

TRABAJO DE GRADUACIÓN
PREVIO A LA OBTENCIÓN
DEL TÍTULO DE
INGENIERO EN ALIMENTOS

AUTOR:
MARCELO NARVÁEZ ANDRADE.

DIRECTOR:
Dr. PIERCOSIMO TRIPALDI C.

CUENCA-ECUADOR

2006

DEDICATORIA:

A mi familia: Marcelo, Dolores,
Raúl, Juan Pablo; quienes me
han apoyado durante mi
formación profesional

AGRADECIMIENTOS:

A mi Dios quien me ha brindado la oportunidad de vivir y ha sido mi camino durante mi formación profesional a lo largo de todos estos años.

A mis queridos padres Marcelo y Dolores, ya que sin su amor, colaboración y apoyo no hubiera sido posible alcanzar esta meta importante.

A mis hermanos Raúl y Juan Pablo, quienes han sido mi aliciente en la abundancia y flaqueza.

A esa persona importante en mi vida, Jenny, quien ha sabido apoyarme, comprenderme, quererme y ser mi compañera de vida.

Deseo expresar mi más grande agradecimiento al Dr. Piercosimo Tripaldi C., quien ha sabido transmitir sus conocimientos, para juntos dejarlos plasmados en ésta tesis de investigación, de la cual se ha convertido en su director.

A mi gran amigo, el Ing. Cristian Rojas Villa, quien ha colaborado como tutor y guía durante la ejecución del trabajo investigativo. Al Ing. Augusto Rodas Ochoa.

A mis compañeros de clase, con quienes he compartido buena parte de mi vida universitaria.

A todas aquellas personas quienes de una u otra forma colaboraron en el desarrollo exitoso de este trabajo.

RESUMEN:

En este trabajo se ha estudiado el efecto de las variables Temperatura de Cuajado, Tiempo de Maduración de la Cuajada, Actividad Enzimática, Presión de Prensado y Tiempo de Maduración del Queso, sobre la calidad gustativa de los quesos de cabra con el fin de determinar condiciones de proceso que produzcan un queso apetecible por un gusto “promedio”.

Se ha utilizado un diseño experimental factorial fraccionario 2^{5-2} , acoplado con un Fold-Over. Se han unificado en una sola respuesta las diferentes sensaciones gustativas utilizando funciones de decisión multicriterio, función de utilidad. Se ha detectado mediante Half-Normal-Plot, que solamente los efectos de la Temperatura de Cuajado y el Tiempo de Maduración del Queso influyen sobre la Función Utilidad.

ABSTRACT:

This work has studied the effect of the variables, clotted temperature, maturity time of the curd, enzymatic activity, pressed pressure and maturity time of the cheese about the gustatory quality of goat cheeses with the purpose of determining process conditions in order to produce a cheese that is accepted in the pleasure average.

A 2^{5-2} fractional factorial experimental design has been used along with a fold-over. It has got in a single answer that different sensations using functions of decision multi approach, utility function. By half-normal-plot has been detected that only the effects of the clotted temperature and the maturity time of the cheese influence on the utility function.

INTRODUCCIÓN	1
<i>CAPÍTULO I</i>	3
<i>LECHE DE CABRA Y SUS CARACTERISTICAS PARA LA OBTENCIÓN DE QUESOS</i>	3
1.1 DEFINICIÓN.....	3
1.2 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LAS LECHES DE CABRA Y OVEJA.....	4
1.2.1 GRASA LÁCTEA	5
1.2.2 PROTEÍNAS.....	6
1.2.3 CARBOHIDRATOS.....	7
1.2.4 SALES MINERALES	8
1.2.5 VITAMINAS	9
1.3 PROCESO TECNOLÓGICO	9
1.3.1 OBSERVACIONES SOBRE EL TRATAMIENTO.....	9
1.3.2 ELABORACIÓN DE QUESOS	10
<i>CAPÍTULO II</i>	13
<i>COAGULACIÓN DE LA LECHE Y CULTIVOS LÁCTICOS</i>	13
2.1 COAGULACIÓN DE LA LECHE.....	13
2.1.1 COAGULACIÓN ÁCIDA.....	13
2.1.2 COAGULACIÓN ENZIMÁTICA	15
2.2 FACTORES QUE INFLUYEN LA COAGULACIÓN DE LA LECHE.....	18
2.2.1 TEMPERATURA	18
2.2.2 CUAJO.....	20
2.3 SUSTANCIAS AUXILIARES EN LA TRANSFORMACIÓN DE LA LECHE.....	27
2.3.1 CULTIVOS BACTERIANOS.....	27
2.3.2 CALCIO.....	31
<i>CAPÍTULO III</i>	32
<i>3. DISEÑO EXPERIMENTAL FACTORIAL FRACCIONARIO Y FUNCIONES DE UTILIDAD</i>	32
3.1 GENERALIDADES DEL DISEÑO EXPERIMENTAL	32
3.1.1 OBJETIVOS DEL DISEÑO EXPERIMENTAL	32
3.1.2 ETAPAS DE UN DISEÑO EXPERIMENTAL	33
3.1.3 VENTAJAS DEL DISEÑO EXPERIMENTAL	34
3.1.4 ESCALADO DE LAS VARIABLES POR INTERACCIÓN	34
3.2 PARÁMETROS CONSIDERADOS EN EL DISEÑO EXPERIMENTAL ..	35
3.2.1 MODULACIONES O FUNCIONES DE UTILIDAD.....	35
3.3 DISEÑO EXPERIMENTAL FACTORIAL FRACCIONARIO.....	39
3.3.1 ANÁLISIS DE UN DISEÑO EXPERIMENTAL FACTORIAL FRACCIONARIO 2^{5-1}	41
3.3.2 DETERMINACIÓN DE LAS CONFUSIONES EN EL DISEÑO EXPERIMENTAL FACTORIAL FRACCIONARIO	42
3.3.3 GENERADOR PARA DETERMINAR LAS CONFUSIONES.....	42
3.3.4 CONCEPTO DE RESOLUCIÓN DE UN DISEÑO	44
3.3.5 DISEÑO FOLD-OVER EN LOS PRINCIPALES EFECTOS DE CONFUSIÓN CON INTERACCIÓN DE DOS VARIABLES	46
3.4 DETERMINACIÓN DEL MODELO DE RESPUESTA.....	47
3.5 ESTIMACIÓN DE LOS EFECTOS SIGNIFICATIVOS	49
3.5 OPTIMIZACIÓN: MÉTODO DE SUPERFICIE DE RESPUESTA.....	52
3.5.1 DISEÑO CENTRAL COMPUESTO	54
3.5.2 OBTENCIÓN DE LA GRÁFICA DE SUPERFICIE POLINOMIAL...	57

<i>CAPÍTULO IV</i>	59
<i>METODOLOGÍA Y</i>	59
<i>DESARROLLO EXPERIMENTAL</i>	59
4.1 METODOLOGÍA.....	59
4.2 SELECCIÓN DE LAS VARIABLES.....	60
4.2.1 DIAGRAMA DE PROCESO PARA ELABORACIÓN QUESO FRESCO.....	60
4.2.2 DEFINICIÓN DE LOS VALORES DE LAS VARIABLES DEL DISEÑO EXPERIMENTAL.....	61
4.2.3 DETERMINACIÓN DE LA MATRIZ DE DISEÑO EXPERIMENTAL FACTORIAL FRACCIONARIO.....	62
4.2.4 DEFINICIÓN DE LA FUNCIÓN RESPUESTA.....	66
4.2.5 ETAPA EXPLORATORIA (SCREENING).....	72
4.3 OPTIMIZACIÓN Y SELECCIÓN DEL PUNTO DE MÁXIMA RESPUESTA.....	78
4.3.1 DEFINICIÓN DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES DEL DISEÑO CENTRAL COMPUESTO.....	78
4.3.2 OBTENCIÓN DEL MODELO DE SUPERFICIE DE RESPUESTA POLINOMIAL.....	79
4.3.3 GRÁFICA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA POLINOMIAL.....	81
4.3.4 VALIDACIÓN DEL MODELO DE SUPERFICIE.....	82
4.4 ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	88
5 CONCLUSIONES.....	89
6 RECOMENDACIONES.....	90
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91

INTRODUCCIÓN

Originariamente el queso fue una forma de conservar los nutrientes principales de la leche, tales como, proteínas y lípidos. Las características que presenta cada variedad de queso están en función del proceso de elaboración y al origen de la leche empleada, es decir, de cabra, oveja o vaca.

Un principio muy útil en Ingeniería de Alimentos es el “Diseño Experimental”, el cual se lo puede aplicar para la investigación, desarrollo y optimización de nuevos procesos y productos, para demostrar hipótesis o teorías científicas, comprender de mejor manera un sistema, obtener la máxima información de un problema en estudio, etc. Se sabe que llevar a cabo un experimento implica probar la validez de una hipótesis planteada sobre el conjunto de variables estudiadas; para posteriormente tomar decisiones que están en función de los objetivos planteados. Para un correcto desarrollo experimental se debe definir claramente el problema en estudio; planteándose preguntas tales como: que se busca?, que le afecta?, como se realiza?, cuando ocurre?, etc.

En esta tesis se ha estudiado el efecto de algunas variables de proceso (temperatura de cuajado, tiempo de maduración de la cuajada, actividad enzimática, presión de prensado y el tiempo de maduración del queso) sobre la calidad gustativa de los quesos de cabra con el fin de determinar condiciones de proceso que produzcan un queso apetecido por un gusto “promedio” de potenciales adquirentes.

Para el efecto se ha utilizado un diseño experimental factorial fraccionario 2^{5-2} , acoplado con un Fold-Over para separar las interacciones de segundo orden de los

efectos principales. En la etapa de screening se han realizado 20 experimentos y cada uno se ha evaluado mediante un panel de catación, en el que participaron estudiantes de la Escuela de Ingeniería en Alimentos de la Facultad de Ciencia y Tecnología de la Universidad del Azuay. Se han unificado en una sola respuesta las diferentes sensaciones gustativas obtenidas para cada experimento utilizando funciones de decisión multicriterio, entre las cuales se ha seleccionado la función de utilidad. Con las respuestas obtenidas se ha estudiado la significatividad de los parámetros de proceso mediante modelización lineal.

Posteriormente se ha aplicado un diseño central compuesto a dos niveles para dos factores para optimizar las variables relevantes del estudio exploratorio, y así obtener el campo de mejor aplicación de las mismas. En este paso final se obtiene un polinomio de superficie de respuesta cuadrático que representa el comportamiento de las variables Temperatura de Cuajado y Tiempo de Maduración del queso en función del gusto.

Narvaez Andrade Hernán

Métodos de diseño experimental factorial fraccionario aplicados a la elaboración de queso de cabra.

Dr. Piercosimo Tripaldi.

15/01/2006

MÉTODOS DE DISEÑO EXPERIMENTAL FACTORIAL FRACCIONARIO APLICADOS A LA ELABORACIÓN DE QUESO DE CABRA.

CAPÍTULO I

1 LECHE DE CABRA Y SUS CARACTERISTICAS PARA LA OBTENCIÓN DE QUESOS

1.1 DEFINICIÓN

Clásicamente la leche se define como un líquido secretado por las glándulas mamarias, ya sea del ser humano como la de animales mamíferos, cuya finalidad es la de servir de alimentación al recién nacido. En los tratados de clásicos de lactología, la definición de leche se refiere única y exclusivamente a las obtenidas de vaca; cuando se trata de leches provenientes de otras especies, se debe indicar la procedencia , tenemos así: leche de búfala, leche de cabra, etc.

La cabra es una de las especies lecheras más difundidas en el mundo después de la vaca, la producción de subproductos a partir de leche de cabra es aún escasa y artesanal en

nuestro medio. La composición de la leche de cabra es mucho más variable que la de vaca.

Tabla 1.1

COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA LECHE DE CABRA			
Componentes	Mínimo (%)	Máximo (%)	Promedio (%)
Grasa	2.4	7.8	4.4
Proteína	2.9	5.6	3.7
Lactosa	4.0	6.3	4.9
Cenizas	0.7	1.0	0.8
Extracto seco	12.0	22.6	13.8

1.2 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LAS LECHE DE CABRA Y OVEJA

La composición química de la leche de cabra influye sobre la calidad de los productos obtenidos del proceso de manufactura de la misma, la influencia del estado de salud de los animales, del manejo y la alimentación, son factores que no se deben dejar a un lado.

Al ser la leche una sustancia viva, su composición química experimenta ciertos cambios en el transcurso de la lactación que deben tenerse en cuenta al momento de la transformación en productos derivados.

1.2.1 GRASA LÁCTEA

La grasa se encuentra en la leche en forma de pequeños glóbulos rodeados por una fina envoltura proteica, el tamaño promedio de estos glóbulos es de 5 μm variando normalmente entre 1 y 20 μm .

Si se deja reposar la leche, debido al bajo peso específico de ésta se forma en la superficie una capa de nata. La velocidad con que se produce este fenómeno depende del tamaño de los glóbulos grasos y del hecho de que en el proceso de separación de la nata se agrupen dichos glóbulos formando racimos que pueden llegar a medir hasta 400 [μm], el aumento de volumen implica el aumento de la fuerza ascensional de los glóbulos. El contenido en grasa de la leche depende mucho de la raza, alimentación y manejo adecuado de los animales, de la fase de lactación y del cuidado que se de en la operación de ordeño. En la leche de cabra el porcentaje de grasa al inicio de la lactación fluctúa en un 5% para aumentar hasta el 10% o más a medida que se acerca al final de la lactación.

La mayoría de glóbulos grasos que se encuentran en forma de triglicéridos formados por la unión del glicerol con ácidos grasos. Los alargamientos diferentes de las proporciones de los ácidos grasos establecen el punto de fusión de la grasa y en consecuencia define la consistencia de la mantequilla que de ella se deriva. Los componentes de la grasa de la leche son generalmente ácidos grasos de cadena corta (cadenas con un número menor a 8 átomos de carbono), esto se deriva de unidades de ácido acético procedentes de la fermentación rumial.

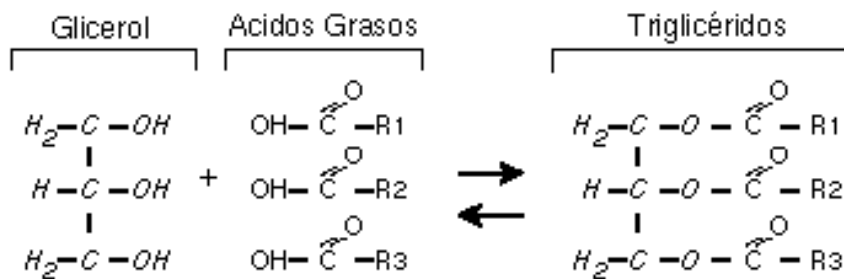


Figura 1.1 Estructura de los triglicéridos (R₁, R₂, R₃, representan las cadenas de ácidos grasos)

1.2.2 PROTEÍNAS

El nitrógeno en la leche en su mayor proporción se encuentra formando parte de las proteínas. El contenido medio de la leche de cabra en proteína es aproximadamente de 3,4%, incluyéndose en estas las caseínas, las que por si solas engloban aproximadamente el 80% del contenido total de proteína. La proteína de la leche contiene elevadas cantidades de aminoácidos esenciales, lo que hace que sea más valiosa comparándola con la proteína vegetal.

Igualmente como la tasa de grasa, también el contenido proteico de la leche depende en gran parte de la raza, manejo, alimentación y fase de lactancia.

A diferencia de la leche de vaca y oveja la leche de cabra tiene menos grasa y proteínas, pues la proteína de la leche caprina es más fina y delicada, esto se aprecia en la obtención de un coágulo más blando; esto se compensa en parte con tiempos más largos de coagulación enzimática en la fabricación de quesos. Debido al menor contenido de proteína muchos productos no se pueden elaborar con la calidad de los de vaca u oveja.

Al fabricar yogurt a partir de leche de cabra, la consistencia del coágulo de yogurt es blando en comparación de los obtenidos a partir de leche de oveja o vaca. Respecto a la fabricación de quesos, el rendimiento es mucho menor comparándola con las anteriormente mencionadas.

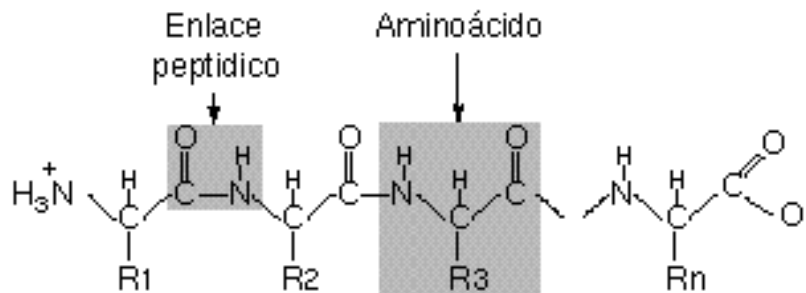


Figura 1.2 Estructura de las proteínas (R_1 , R_2 , R_3 , R_n , representan los radicales específicos de cada aminoácido.

1.2.3 CARBOHIDRATOS

Dentro de los azúcares predominantes en la leche tanto de cabra como de otras especies tenemos a la lactosa, que es el nutriente indispensable para las bacterias lácticas en su participación en la elaboración de productos lácteos. Estos microorganismos al crecer y al multiplicarse desdoblán la lactosa produciendo ácido láctico y metabolitos secundarios que potencian el flavor de los productos obtenidos, así tenemos acetaldehído, acetoínas lactosas, alcohol gas, etc.

La lactosa es un di-ósido formado por α -glucosa, β -glucosa y β -galactosa; pudiendo encontrarse en dos formas isoméricas: α ó β . La lactosa comparándola con la sacarosa no es demasiado soluble. El poder edulcorante de la lactosa comercial es 4 veces menor que la sacarosa; pudiendo aumentar su poder edulcorante por hidrólisis e inversión. El

azúcar invertido formado por galactosa y glucosa tiene un poder edulcorante parecido al de la sacarosa

En la elaboración de derivados lácteos aproximadamente se desdobra un 1% de la lactosa en ácido láctico.

No todos los derivados lácteos contienen proporciones similares de lactosa.

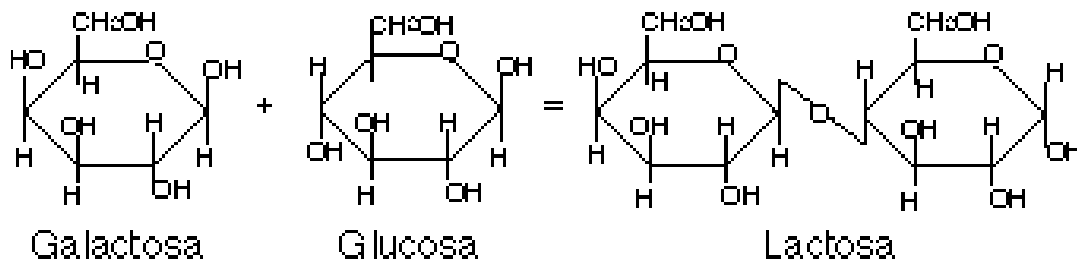


Fig. 1.3 La lactosa es formada en la ubre a partir de los monosacáridos glucosa y galactosa.

1.2.4 SALES MINERALES

La leche posee una excelente fuente de la mayoría de minerales requeridos para el crecimiento de lactantes. Elementos como el calcio, magnesio, potasio, sodio, fósforo y cloro, al igual que elementos trazas como el hierro, cobre, zinc, molibdeno, yodo y flúor, todos ellos se encuentran presentes en la leche. Para la elaboración de queso resulta de vital importancia el contenido en calcio, que es requerido para la coagulación por acción del cuajo. Cuando la leche se somete a procesos térmicos, tales como la pasteurización, se pierde un porcentaje de sus sales minerales, debiendo adicionarse cloruro de calcio para recuperar el calcio indispensable para la coagulación.

1.2.5 VITAMINAS

La leche contiene importantes vitaminas para el crecimiento, como la A, B₁, B₂, B₆, B₁₂, ácido Fólico, ácido Pantoténico, Niacina, C, D y E, cuyos valores dependen en gran parte de la alimentación, sobrecargas térmicas, etc. De esta manera vitaminas termolábiles como la “C” se la encuentra en menor cantidad en leches acidificadas o yogurt que en quesos elaborados a partir de leche cruda. Así pues, resulta sumamente difícil expresar el contenido en vitaminas en productos lácteos con exactitud, pues el tratamiento de la leche, duración y tipo son diferentes para cada fabricante.

1.3 PROCESO TECNOLÓGICO

1.3.1 OBSERVACIONES SOBRE EL TRATAMIENTO

Al tratar con leche de cabra debe tenerse en cuenta su bajo contenido en proteína y la constitución delicada de la misma comparándola con la de oveja; esto se aprecia claramente en la obtención de una cuajada mas blanda, y se encuentra compensada con tiempos de coagulación más largos (Shoolz W,103). Generalmente los productos que pueden obtenerse a partir de leche de oveja también pueden ser los mismos elaborados con leche de cabra.

1.3.2 ELABORACIÓN DE QUESOS

En la fabricación de quesos existen tres factores potencialmente determinantes en la leche:

- ✓ Contenido de proteínas (caseínas)
- ✓ Contenido en grasa
- ✓ Calidad microbiológica y sanitaria

La elaboración de quesos es una técnica muy antigua, y depende de cada variedad, teniendo así puntos del proceso muy similares entre unos y otros. La fabricación de quesos se inició con el queso fresco, para el cual presentamos el procedimiento general utilizado desde hace décadas:

1.3.2.1 PASTEURIZACIÓN

Procedimiento en el que la leche se somete a la acción de la temperatura con la finalidad de destruir o reducir a la mínima cantidad la carga bacteriana patógena o indeseable adquirida durante las distintas fases de producción recolección y transporte. Este proceso se realiza sometiendo la leche a una temperatura de 72[°C] durante un tiempo promedio de 15 [seg], para posteriormente ser enfriada bruscamente hasta 4[°C].

1.3.2.2 ADICIÓN DE CULTIVO

Una vez que la leche se ha sometido a la pasteurización y al llegar a la temperatura de coagulación se adiciona fermento láctico; este proceso busca acelerar la producción de ácido láctico y metabolitos secundarios de la fermentación a partir de la lactosa por acción de las bacterias lacto-acidófilas presentes en el fermento.

1.3.2.3 CUAJADO

Este procedimiento consiste en la solidificación de la leche producido por la precipitación de las caseínas (proteínas mayoritarias en la leche), la cual encierra la mayor parte de la grasa. Esta operación se la puede realizar por medio de dos vías: la primera sea mediante un cuajado ácido natural generado por las bacterias lácticas presentes naturalmente en la leche; y la segunda mediante un cuajado enzimático, este procedimiento se lo realiza con adición de agente coagulante (cuajo). El coágulo obtenido se parece a una gelatina blanca y se forma aproximadamente al cabo de unos 30 [min] posteriores a la agregación del cuajo. La temperatura del cuajado es una variable muy importante que debe ser controlada y su estudio depende de las condiciones del modelo experimental.

1.3.2.4 CORTE DE LA CUAJADA

Después de que ha pasado la etapa de cuajado, se procede al corte de la cuajada para de esta manera facilitar la exudación del suero, que debe ser de tal manera que siempre se vea granos de cuajada en la superficie del suero. La cuajada se fragmenta en cubitos de

un tamaño promedio de 2 [cm]. La forma mas rápida de realizar esta operación se la consigue utilizando marcos alambrados o liras. Un primer corte se lo realiza a lo largo para formar tiras, para en un segundo corte que se lo efectúa a lo ancho formar cubitos.

1.3.2.5 REPOSO Y MADURACIÓN DEL COÁGULO

A continuación se deja reposar la cuajada troceada para facilitar el exudado del suero. En esta etapa la superficie se cubre de suero debido a que los granos de cuajada se depositan en el fondo del recipiente por su mayor peso, pudiendo agitarse (en caso de algunos quesos). Además en este proceso la cuajada gana consistencia. Es una operación intermedia entre el corte y el desuerado.

1.3.2.6 ESCURRIDO O DESUERADO

Mediante el desuerado se elimina gran parte del suero cargado de lactosa y ácido láctico que ya no se necesitan o que son considerados como subproductos en la elaboración de quesos. Además permite compactar el coágulo y facilitar el posterior moldeado.

1.3.2.7 MOLDEADO

En esta operación los granos de cuajada se depositan dentro de un molde para darle forma de queso deseado. Cada cierto tiempo se debe voltear los moldes para facilitar un desuerado homogéneo y también obtener quesos de superficie lisa y de buen aspecto; para mantener esta forma se acostumbra prensar los de grano pequeño o mediano

1.3.2.8 SALADO

El salado se lo realiza al finalizar el proceso de moldeo. Es muy importante para la formación de la corteza y además contribuir al sabor peculiar del queso. Se lo puede realizar en seco o en un baño de sal muera. La ventaja de este último está en que permite controlar mejor la cantidad de sal captada por las piezas, además es un procedimiento mas barato por precisar menos mano de obra. En el salazonado en seco no se puede estimar la cantidad de sal que tomó el queso y que cantidad de esta se perdió por exudado.

CAPÍTULO II

COAGULACIÓN DE LA LECHE Y CULTIVOS LÁCTICOS

2.1 COAGULACIÓN DE LA LECHE

Dentro de las proteínas de la leche, según se estudió en el capítulo anterior las que se encuentran en mayor proporción son las caseínas. Para que la caseína coagule y precipite; es decir para que cambie su estado; se debe modificar antes la estructura descrita de las proteínas. Este procedimiento se puede lograr de dos formas.

2.1.1 COAGULACIÓN ÁCIDA

Por coagulación ácida se entiende a la obtenida únicamente por el efecto de un ácido. El ácido láctico al formarse en la leche por desdoblamiento de la lactosa bajo la acción

de bacterias lactoacidófilas, o también por adición de ácidos minerales como por ejemplo el ácido clorhídrico.

Estudiando la fórmula química de un ácido, se observa que su molécula siempre lleva un átomo de hidrógeno cargado positivamente. Cada uno de estos átomos de hidrógeno de los ácidos presentes en la leche, fija una carga negativa sobre la κ -caseína, equilibrando así las cargas negativas excedentes de la caseína; así las miscelas de caseína pierden su envoltura híbrida. Con cierta concentración de iones hidrógeno positivos se equilibra el número de cargas positivas y negativas; consecuencia de este estado neutro, no existe repulsión entre las miscelas de caseína, haciéndose inestable y floculan al unirse entre sí, es decir precipitan. Este instante se conoce con el nombre de punto isoeléctrico. La conglomeración espontánea de las miscelas de caseína proporciona una cuajada fina y delicada.

El pH que se alcanza en el punto isoeléctrico es una función directa de la temperatura. A temperatura mas baja de cuajado, mas bajo también es el valor del pH. En condiciones normales de temperatura (25-30[°C]), el pH fluctúa entre 4.9 a 4.6 aproximadamente. Este punto isoeléctrico de la leche se reconoce cuando pasa del estado líquido al sólido (cuajada). Es muy interesante conocer que la coagulación ácida de la caseína es un proceso reversible; es decir si se agrega un álcali tipo lejía, existe nuevamente cargas negativas en la caseína y cuando existe un número suficientemente grande de éstas, las miscelas de caseína se repelen nuevamente entre sí, restaurándose de esta manera.

La leche coagulada por efecto ácido se torna nuevamente líquida, sin poder diferenciarse a simple vista de la leche fresca, debido a que en la coagulación ácida se

suprimió únicamente la carga negativa de la superficie de las miscelas de caseína, pero manteniendo la propia miscela inalterada. Este proceso solo puede ser estudiado mediante análisis químico.

2.1.2 COAGULACIÓN ENZIMÁTICA

Esta coagulación se debe a la precipitación de la caseína por efecto de un agente coagulante (cuajo). Los cuajos vienen en presentación líquida o en polvo, en los cuales se encuentra un enzima cuya propiedad principal es la de romper la porción hidrofílica de la κ -caseína. Con esta hidrólisis de la caseína se pierde la parte hidrofílica, es decir la envoltura hídrica perdiéndose las cargas negativas; igualmente se pierde la capa protectora frente al calcio y las caseínas sensibles al calcio reaccionan con el mismo; formándose así los llamados puentes de calcio.

Estos componentes se generan en una red tridimensional; adoptando el conjunto un aspecto esponjoso y la leche coagula. En los espacios libres de esta red tridimensional existe agua, en la cual está disueltos diversos componentes de la leche, como sales minerales y azúcar, también grasa; éste es el denominado suero. La leche recientemente coagulada, normalmente tiene tendencia a compactarse debido a la reducción de los espacios de unión entre las miscelas de caseína y la multiplicación de los puntos de unión, de esta manera tiende a encogerse.

Como el suero no puede comprimirse, es expulsado en esta contracción. Dependiendo de la solidez de los puentes salinos o la fuerza de estos enlaces, y bajo acción de la temperatura, tiempo y acidificación, se produce un mejor o peor desuerado. La

formación de los puentes salinos depende de la cantidad de calcio presente en la leche, por otra parte la intensidad de la fuerza de contracción depende de la acidificación y la temperatura. A mayor temperatura y concentraciones altas de calcio, mayor es la cantidad de suero que se expulsa.

En la elaboración de queso la contracción de la estructura cálcica y por consiguiente el desuerado, se ve favorecida por la división del coágulo, agitación y calentamiento de la mezcla cuajada-suero. La coagulación se produce a temperaturas entre 20 y 40[°C], a diferentes temperaturas se producen una modificación en el proceso. Se distinguen tres fases en la coagulación por acción del cuajo:

Fase enzimática:

Es en la cual la enzima del cuajo separa la κ -caseína. Se inicia con la adición del cuajo y se prolonga hasta el inicio de la formación de los puentes calcio-salinos.

Fase reticular:

Es la segunda fase en la cual se forman los puentes salinos y también la red tridimensional.

Fase de sinéresis:

En ésta se genera la contracción de los puentes calcio-salino y consecuentemente se produce el desuerado, ésta constituye la tercera fase de coagulación.

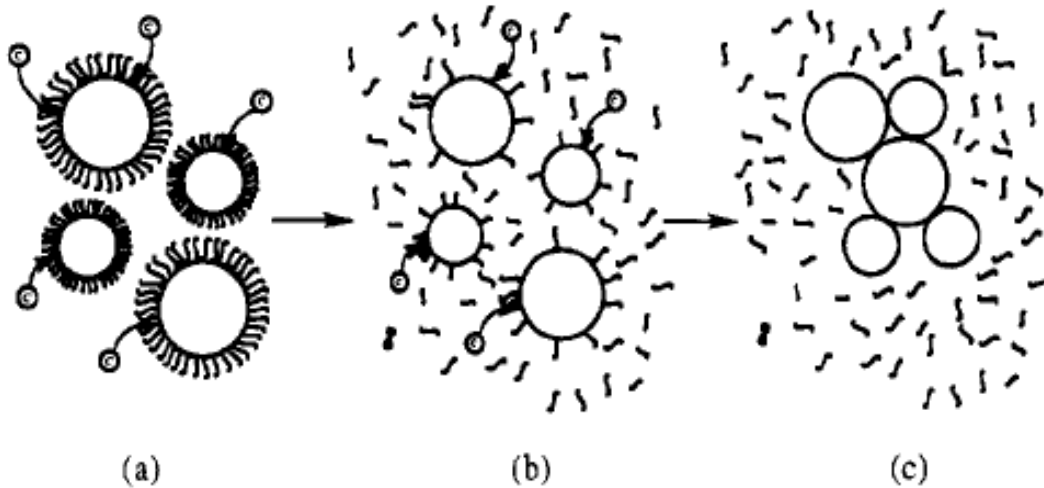
En la práctica normal de elaboración de queso, se encuentran estas tres fases con otras denominaciones.

De esta manera, la fase enzimática se denomina tiempo de floculación, que se da desde la adición del cuajo hasta el inicio de la coagulación de la leche. El tiempo contado desde la adición del cuajo hasta la coagulación de la leche, recibe el nombre de tiempo de coagulación, englobando por consiguiente la fase enzimática y reticular.

La fase de sinéresis inicia con el corte de la cuajada y se extiende hasta el desuerado total del queso. Por lo tanto, comprende el tiempo de desuerado propiamente dicho, así también la salida del suero en los moldes o en la prensa.

Cada una de estas tres fases puede ser influenciada por diversos factores. Estos pueden influir únicamente sobre una o dos fases, o también sobre las tres fases de la coagulación, afectando de esta manera la fabricación del queso. Al conocer los procesos que tiene lugar en esta coagulación, se identifica que la cantidad del fermento láctico, de la temperatura, del contenido de grasa, de una correcta acidificación o del calentamiento de la leche; permite en cualquier momento elaborar quesos de la consistencia deseada.

El efecto del enzima quimosina en la coagulación de la leche se esquematiza en la siguiente figura :



- (a) Miscelas de caseína con las capas de κ -caseína antes de ser atacada por la quimosina ©.
- (b) Miscelas en partición por eliminación de la κ -caseína.
- (c) Miscelas en proceso de agregación.

2.2 FACTORES QUE INFLUYEN LA COAGULACIÓN DE LA LECHE

2.2.1 TEMPERATURA

Cuanto más elevada sea la temperatura (20-40[°C]), más cortos son los tiempos de floculación y coagulación. A menos de 20[°C] es muy escasa la acción del cuajo y por debajo de 10[°C] ya no se produce prácticamente ningún entramado a base de puentes calcio- salinos. De esto es responsable la capacidad fijadora de agua a la caseína; dicha capacidad depende a su vez de la temperatura, resultando más intensa cuando más baja es ésta. Por debajo de los 10[°C] es tan gruesa la capa de agua que envuelve a la caseína, que desarrolla acción protectora de las caseínas α , β y γ frente al calcio.

Entonces no se puede producirse ningún entramado. Si vuelve a subir la temperatura, la capa de agua es menor y se instaura puentes salinos. Tampoco por encima de los 40[°C] se produce ninguna coagulación pues en este caso el principio activo que es el cuajo resulta inactivo y destruido.

Un microorganismo tiene una temperatura óptima para su crecimiento. Si consideramos la variación de la velocidad de crecimiento (m) en función de la temperatura de cultivo, podemos observar una temperatura mínima por debajo de la cual no hay crecimiento; a temperaturas mayores se produce un incremento lineal de la velocidad de crecimiento con la temperatura de cultivo hasta que se alcanza la temperatura óptima a la que "m" es máxima.

El incremento de la tasa de crecimiento (μ) con la temperatura se debe al incremento generalizado de la velocidad de las reacciones enzimáticas con la temperatura. Se denomina coeficiente de temperatura a la relación entre el incremento de la velocidad de reacción y el de temperatura. En términos generales, la velocidad de las reacciones bioquímicas suele aumentar entre 1.5 y 2.5 veces al aumentar 10[°C] la temperatura a la que tienen lugar. La ausencia de crecimiento ($\mu=0$) a temperaturas muy bajas se debe a la reducción de la velocidad de crecimiento y al cambio de estado de los lípidos de la membrana celular que pasan de ser fluidos a cristalinos, impidiendo el funcionamiento de la membrana celular. La muerte celular a altas temperaturas se debe a la desnaturalización de proteínas y a las alteraciones producidas en las membranas lipídicas a esas temperaturas.

A temperaturas muy bajas, el metabolismo celular es muy bajo y las células paran de crecer. Sin embargo, cuando la temperatura es superior a la óptima, se produce la muerte celular rápidamente y las células no pueden recuperar su capacidad de división si baja posteriormente la temperatura.

Los microorganismos se deben mantener a la temperatura adecuada para que su crecimiento sea el deseado. En cualquier caso, hay que tener en cuenta los problemas derivados de las altas temperaturas y controlar la de los fermentadores para evitar la esterilización de los cultivos.

2.2.2 CUAJO

Los enzimas empleados en la manufactura de las diferentes variedades de quesos se los puede extraer de diferentes fuentes, tales como: animales, plantas y los generados por microorganismos.

El cuajo es uno de los ingredientes más importantes en la fabricación de quesos y sin él, la gran mayoría de los quesos no podría siquiera ser fabricada. El cuajo se compone básicamente de una mezcla de enzimas, que son compuestos químicos que tienen la propiedad de alterar las proteínas de la leche y transformarlas en cuajada. Estos compuestos químicos son llamados de Renina y Pepsina.

La renina es un enzima proteolítica que es secretado por la mucosa gástrica del cuarto estómago de los terneros lactantes. Se secreta como un precursor inactivo, denominado pro-renina.

El cuajo posee dos enzimas: la quimosina o componente principal y la pepsina.

Posterior al destete, se reduce la producción de quimosina, pasando a ser la pepsina el componente en mayor proporción.

Con la estandarización e introducción del cuajo bovino en 1874, Chr. Hansen A/S Dinamarca, se convirtió en la primera compañía en estandarizar, producir y comercializar éste enzima coagulante para la elaboración de quesos. Para la fabricación de quesos se emplean enzimas coagulantes de la leche de diferente procedencia. En los cuajos y coagulantes empleados para la fabricación de quesos las enzimas activas son proteasas del ácido aspártico EC 3.4.23 (IUBMB, 1992).

2.2.2.1 TIPOS DE CUAJO Y ENZIMAS COAGULANTES

Gran variedad de cuajos y coagulantes se han utilizado para la elaboración de quesos, y han sido estudiados recientemente por diversos autores (Harboe, 1985, 1992; Scott, 1986; Guinee y Wilkinson, 1992; Grag y Johri, 1994; Wigley, 1996). Debido al incremento de la producción de queso a nivel mundial, la demanda de cuajo se ha incrementado desmesuradamente. Por otro lado el precio se ha disparado por completo debido por una parte, a que cada vez existen menos animales lactantes disponibles, y por otro lado al coste que implica su extracción. Como consecuencia se ha despertado un interés enorme por el desarrollo y utilización de diversas enzimas coagulantes.

2.2.2.1.1 COAGULANTES ANIMALES

Enzimas de origen animal son, entre otros, la pepsina, que se obtiene del estomago de cerdo o vaca, y la tripsina enzima del páncreas. El cuajo animal suele ser una mezcla de cuajo de ternero y pepsina.

Extractos provenientes de estómagos de terneros jóvenes tienen un alto contenido de quimosina, siendo su composición, normalmente un 80% quimosina y 20% pepsina.

El cuajo de ternero es el producto tradicionalmente utilizado para la elaboración de quesos, siendo el producto de referencia en cuanto a composición y rendimiento. El cuajo de bovino adulto es el de mayor uso alternativo del cuajo de ternero, debido a que contiene la misma composición enzimática activa. El mayor contenido de pepsina de los cuajos de bovino adulto lo hace más sensible al pH y poseen en general una mayor actividad proteolítica.

En algunos casos para abaratar la producción de cuajo y así hacerlo más atractivo al quesero, se emplean estómagos de cerdos en su elaboración. El cuajo elaborado llega a contener porcentajes considerables de “Pepsina Suina”. Sus efectos son desastrosos para la fabricación de quesos, pues el rendimiento cae, porque la coagulación de la leche no se desarrolla del mismo modo. Además, durante la maduración del queso, desarrolla sabores amargos, debido a que la pepsina suina es mucho más fuerte cuando actúa sobre proteínas, contrariamente a lo que sucede con la pepsina de origen bovino. Este cuajo se lo utiliza en muy baja proporción, y se caracteriza por presentar una elevada actividad proteolítica y una alta inestabilidad, especialmente frente al pH.

2.2.2.1.2 COAGULANTES DE ORIGEN VEGETAL

La extracción de enzimas coagulantes de origen vegetal tiene un amplio espectro de utilización dentro del área de los alimentos, por esta razón se ha buscado aislarlas para probarlos como cuajos. Estos son la papaína, enzima proteolítico procedente del jugo lechoso del papayero americano, Carica papaya, la ficina, del jugo de especies sudamericanas de Picus, y la bromelina, obtenida de la piña. Los resultados experimentales con estas enzimas no han sido satisfactorios debido a que su acción proteolítica es demasiado intensa.

2.2.2.1.3 COAGULANTES MICROBIANOS

En los últimos 20 años se ha venido utilizando un número creciente de enzimas de origen microbiano en la fabricación de queso. Productos metabólicos de ciertos mohos y bacterias tienen las propiedades que el cuajo de ternero, pero mucho más barato de obtener. Así, en la fabricación de cuajo microbiano se utiliza sobre todo el moho *Rizomucor mihei*.

De los tres coagulantes microbianos usados en la quesería, el de *R. miehei* es el predominante. Existen tres tipos de enzimas.

1. La nativa, comúnmente denominada “Tipo L”, caracterizada por tener una elevada estabilidad térmica y significativamente de mayor actividad proteolítica que el cuajo de ternero.

2. La enzima desestabilizada, denominada “Tipo TL”, elaborada por oxidación de la enzima nativa y se caracteriza por ser termolábil, con mayor dependencia al pH y menos actividad proteolítica que la tipo L.
3. La extra termolábil, denominada “Tipo XL”, obtenida mediante una mayor oxidación que la tipo TL. Se caracteriza por ser extra termolábil, con mayor dependencia al pH y de menor proteólisis que la tipo TL.

Los cuajos obtenidos de *Rizomucor pusillus* tienen gran similitud a los de *R. miehei*, aunque presenta mayor dependencia al pH y termoresistencia, lo cual limita su uso en procesos en los que el suero se emplea como subproducto.

2.2.2.1.4 QUIMOSINA PRODUCIDA POR FERMENTACIÓN

La quimosina es producida por fermentación de un sustrato por parte de un microorganismo. La misma puede ser producida por diferentes microorganismos, tales como *Aspergillus Níger*, *Escherichia coli* y *Kluyveromyces lactis*.

La actividad de esta enzima es igual o más alto que la quimosina de ternero, obteniéndose así quesos de alta calidad. Presenta ciertas ventajas como:

1. Facilita una mayor retención de sólidos.

2. En los quesos maduros permite un mejor desarrollo del aroma, de esta manera aumenta el rendimiento en la producción de quesos.

Cada tipo de cuajo tiene diferentes propiedades, por tanto su comportamiento no será igual, especialmente en lo referente a las condiciones de pH del medio y temperatura.

En la siguiente tabla se presenta una sinopsis de los coagulantes de mayor uso y sus componentes enzimáticos:

Tabla 2.1

COAGULANTES DE USO COMÚN Y SUS ENZIMAS COMPONENTES			
Grupo	Fuente	Ejemplo de nombres	Componente enzimático activo
Animal	Estomago Bovino	Cuajo Bovino, cuajo de ternero, cuajo en pasta	Quimosina A y B, Pepsina (A) y Gastricina ídem más Lipasa
	Estómago Ovino	Cuajo de cordero, oveja	Quimosina y Pepsina
	Estómago Caprino	Cuajo de cabrito, cabra	Quimosina y Pepsina
	Estómago Porcino	Coagulante porcino	Pepsina A y B, Gastricina
Microbiano	Rhizomucor miehei	Hannilase	Proteasa aspártica de R. miehei
	Rhizomucor pusillus	Coag. Pusillus	Proteasa aspártica de R. pusillus
	Cryphonectria parasitica	Coagulante de parasitica	Proteasa aspártica de C. parasitica
FPC (Quimosina producida por fermentación)	Aspergillus niger	Chymax	Quimosina B
	Kluyveromyces lactis	---	Quimosina B
Vegetal	Cynara cardunculus	Cardoon	Cyprosina 1,2,y3 y/o Cardosina A y B

Fuente: <http://www.fepale.org/>

Independientemente del cuajo empleado, en la práctica, se recomienda no diluirlo hasta el momento de su utilización, especialmente con los de origen animal debido a su inestabilidad a pH neutro o alcalino. Cuando se adiciona cloruro de calcio a la leche, el cuajo no debe adicionarse antes de que esta sal se haya disuelto completamente. Su almacenamiento se lo debe realizar cuidadosamente en un recipiente opaco y de preferencia en frío.

2.3 SUSTANCIAS AUXILIARES EN LA TRANSFORMACIÓN DE LA LECHE

2.3.1 CULTIVOS BACTERIANOS

Las bacterias acidoláticas se agregan en forma de cultivo puro. Con este nombre se designa un cultivo enriquecido con cepas bacterianas específicas. En la fabricación de la mayoría de los productos se utilizan cultivos mesófilos.

Bacterias mesófilas son aquellas que viven de forma óptima y se multiplican con máxima rapidez en la zona térmica normal, comprendida entre 20 y 30[°C] . Sólo en pocos productos son necesarias bacterias acidoláticas termófilas (resistentes al calor); Estas viven mejor a temperaturas de 35-45[°C]; productos elaborados con cultivos termófilos son, por ejemplo, el yogurt y algunos quesos duros.

Requisito previo para la fabricación de productos de calidad, con las deseables cualidades de sabor y consistencia, es sembrar con el cultivo únicamente las deseables bacterias acidoláticas y ningún otro tipo de microorganismo. Por ello, dejar sólo reposar la leche cruda caliente esperando a que acidifique para añadir después el cultivo,

no es ciertamente procedimiento correcto. Las consecuencias serían la infección con otras especies y cepas bacterianas.

En los cultivos mesófilos ordinarios hay contenidas cuatro cepas, que tienen distintas propiedades y cometidos. Los nombres de estas cepas son:

- ✓ *Streptococcus lactis*
- ✓ *Streptococcus cremoris*
- ✓ *Streptococcus diacetylactis*
- ✓ *Leuconostoc citrovorum*

Dos de estas cepas, concretamente *Sc. lactis* y *Sc. cremoris* son puras formadoras de ácido, desdoblando por consiguiente la lactosa solamente en ácido. Las otras dos cepas, *Sc. diacetylactis* y *Leuconostoc*, generan también sustancias aromáticas y gas, además de ácidos. El *Sc. diacetylactis* produce intenso aroma y mucho gas, mientras que el *Leuconostoc citrovorum* proporciona un aroma fino y delicado y relativamente poco gas. De acuerdo con los porcentajes en que se mezclen estas cuatro cepas, el cultivo resultante tendrá unas u otras propiedades. La oferta de los fabricantes de cultivos comprende un amplio espectro de mezclas diversas, pensadas para finalidades específicas.

Los cultivos termófilos están constituidos por *Streptococcus thermophilus* y dependiendo del producto, varios lactobacilos tales como *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lb. subsp. bulgaricus* (cultivos de yogur) o *Lb. helveticus*.

También en este caso tienen las cepas propiedades y misiones diferentes. Se ha encontrado excepciones en la producción de quesos tradicionales italianos como mozzarella, u otros como el Brie estabilizado, donde se utilizan cultivos que contienen solamente *S. thermophilus*. Las características del *S. thermophilus* son muy variadas, mientras que la producción de mozzarella requiere una actividad de acidificación muy rápida, el Brie estabilizado requiere un perfil de acidificación lento y un alto pH final. En la producción de muchos quesos de tipo suizo, los *S. thermophilus* son combinados con lactobacilos reductores de galactosa, como el *Lb. helveticus*.

Tabla 2.2

BACTERIAS LÁCTICAS USADAS EN VARIOS TIPOS DE CULTIVOS TÍPICOS Y SU APLICACIÓN		
Tipo	Especie	Producto
Mesófilos		
Tipo "O (¹)"	Lactococcus lactis Subs.. lactis Lc. Lactis subsp. Cremoris	Queso Cheddar Queso Feta
Tipo "LD (²)"	Lc. Lactis subsp. Lactis Lc. lactis subsp. Cremoris Lc. lactis subsp. lactis biovar diacetylactis Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris	Queso Gouda Queso Tilsiter Queso Suave en tarrina
Termófilos		
Tipo Streptococcus	Streptococcus thermophilus	Queso tipo Suizo, Mozzarella, Brie Estabilizado,
Tipo yogurt	S. thermophilus Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus Lb. Helveticus Lb. Delbrueckii subsp. Lactis	Queso Mozzarella Queso para pizza Queso tipo Suizo Queso Grana
Tipos mezclados		
Tipo RST	Lc. lactis subsp. Lactis Lc. lactis subsp. Cremoris S. thermophilus	Queso Cheddar
Tipo FRC	Lc. lactis subsp. Lactis Lc. lactis subsp. Cremoris S. thermophilus Lb. delbrueckii subsp. Bulgaricus	Queso Feta Queso salado en seco

Fuente: <http://www.fepale.org/>

2.3.2 CALCIO

El calcio es necesario para el normal desarrollo de la coagulación enzimática, ya que sin el no pueden formar puentes calcio-salinos y la leche no coagula. La leche cruda contiene suficiente calcio, en condiciones normales, por lo que no necesita agregarse más.

El calcio se encuentra presente en la leche en tres formas: coloidal, disolución verdadera y ligado a la caseína.

El comportamiento de la leche en la coagulación, corresponde al calcio ligado a la caseína, la capacidad para coagularse por efecto del cuajo se ve mejorada cuando este calcio está en elevada proporción. Si la leche se calienta (pasteurizada como máximo a 70[°C]) el calcio presente en ella ligado a la caseína se transforma en otras formas solubles, no estando ya disponible para la coagulación ni para la constitución de puentes salinos. Ello obliga entonces a agregar calcio expresamente, lo cual está permitido en forma de cloruro de cálcico.

CAPÍTULO III

3. DISEÑO EXPERIMENTAL FACTORIAL FRACCIONARIO Y FUNCIONES DE UTILIDAD

3.1 GENERALIDADES DEL DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental es una técnica científica ampliamente utilizada para la planificación y análisis de experimentos y así obtener información de calidad. Dicha información facilita el desarrollo de nuevos productos y procesos, comprender de mejor manera un sistema en estudio, sea éste un procedimiento analítico o un proceso industrial; así de cómo poder optimizarlos. Para que la información obtenida sea de calidad, la experimentación debe ser cuidadosamente planificada.

3.1.1 OBJETIVOS DEL DISEÑO EXPERIMENTAL

Es importante seguir una metodología matemática y estadística en la cual indique cómo planificar la secuencia de experimentos de tal forma que se minimice el coste y tiempo de la experimentación y la influencia de los errores experimentales sobre la información buscada. Esta planificación y análisis es el principal objetivo que busca cumplir el Diseño Experimental.

El diseño experimental busca cumplir también los siguientes objetivos:

- ✓ Conocer inicialmente el sistema en estudio, para definir las variables y sus valores en los que se debe centrar el análisis experimental.
- ✓ Buscar la influencia de los factores sobre los resultados observados. Determinar de todos los factores que afectan en el proceso ¿cuáles influyen más?, ¿cómo interaccionan entre ellos?.
- ✓ Permite obtener superficies de respuestas. ¿Qué valores de las variables proporcionan las respuestas de mayor calidad?.
- ✓ Determinar la robustez del sistema. ¿Cómo afectan a la respuesta variaciones no controladas en el valor de los factores?.

3.1.2 ETAPAS DE UN DISEÑO EXPERIMENTAL

De manera general el diseño experimental requiere considerar las siguientes etapas en su ejecución:

1. Conocer el problema y definir el objetivo.
2. Identificar los factores que podrían influir en la función objetivo, y los valores que éstos pueden tomar. Entre estos valores se buscará la información que se necesita.

3. Definir el plan de experimentación.
4. Realizar los experimentos con los valores de las variables decididos en el punto anterior para obtener los valores de las respuestas estudiadas.

3.1.3 VENTAJAS DEL DISEÑO EXPERIMENTAL.

1. Elimina la influencia de las variables perturbadoras, mediante el efecto de la combinación .de los niveles altos/bajos de experimentación (aleatorización)
2. El control y manipulación de las variables predictorias clarifican la dirección y naturaleza de la causa.
3. Flexibilidad, en la manipulación e interpretación de los datos.

3.1.4 ESCALADO DE LAS VARIABLES POR INTERACCIÓN

En el estudio experimental de un problema, muy comúnmente, se utilizan variables con unidades de medidas diferentes; así, variables con unidades de medidas pequeñas (valores grandes) pesarán más en el modelo que otras. Por ello es estrictamente necesario homogenizar las escalas de medidas de las variables llevando cada una a un rango máximo y mínimo de variación predefinido. Esta transformación se conoce como “Range Scaling” o Escalado de las Variables por zonas, el cual se lo consigue aplicando la siguiente ecuación (Gareth A,17):

$$Z' = 2 \cdot \frac{Z - Z_{MIN}}{Z_{MAX} - Z_{MIN}} - 1$$

(3.1)

$$-1 \leq Z' \leq +1$$

Z = valor máximo de cada variable $Z' = +1$

Z = Valor mínimo de cada variable $Z' = -1$

El escalado de variables permite una mejor interpretación de los factores, debido a que el coeficiente calculado del modelo está directamente relacionado con los factores.

3.2 PARÁMETROS CONSIDERADOS EN EL DISEÑO EXPERIMENTAL

3.2.1 MODULACIONES O FUNCIONES DE UTILIDAD

En el diseño experimental las respuestas obtenidas de los diferentes parámetros evaluados (color, olor, sabor, textura, etc.) en cada experimento se estudian separadamente o, mejor se las debe unificar en una única respuesta con el fin de obtener una evaluación global, además si se estudia un problema con muchos atributos en forma global es probable premiar o penalizar cada atributo. Su fórmula es (gateth A 34):

$$u_{ki} = f_k(X_{ki}) \qquad 0 \leq u_{ki} \leq 1$$

(3.2)

Donde f es el tipo de función definida por el experimentador, k es el criterio seleccionado, X_{ki} es el valor de la i -ésima muestra por el k -ésimo criterio (Figura 3.2)

La respuesta de la función de utilidad parcial o total está comprendida entre los valores de cero (respuesta no aceptable) y uno (respuesta excelente), según la siguiente fórmula:

$$FU = \sum_k w_k u_{ki} \qquad 0 \leq FU \leq 1$$

(3.3)

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

Frecuentemente las funciones de utilidad son:

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

La siguiente figura esquematiza las graficas de las funciones de utilidad descritas:

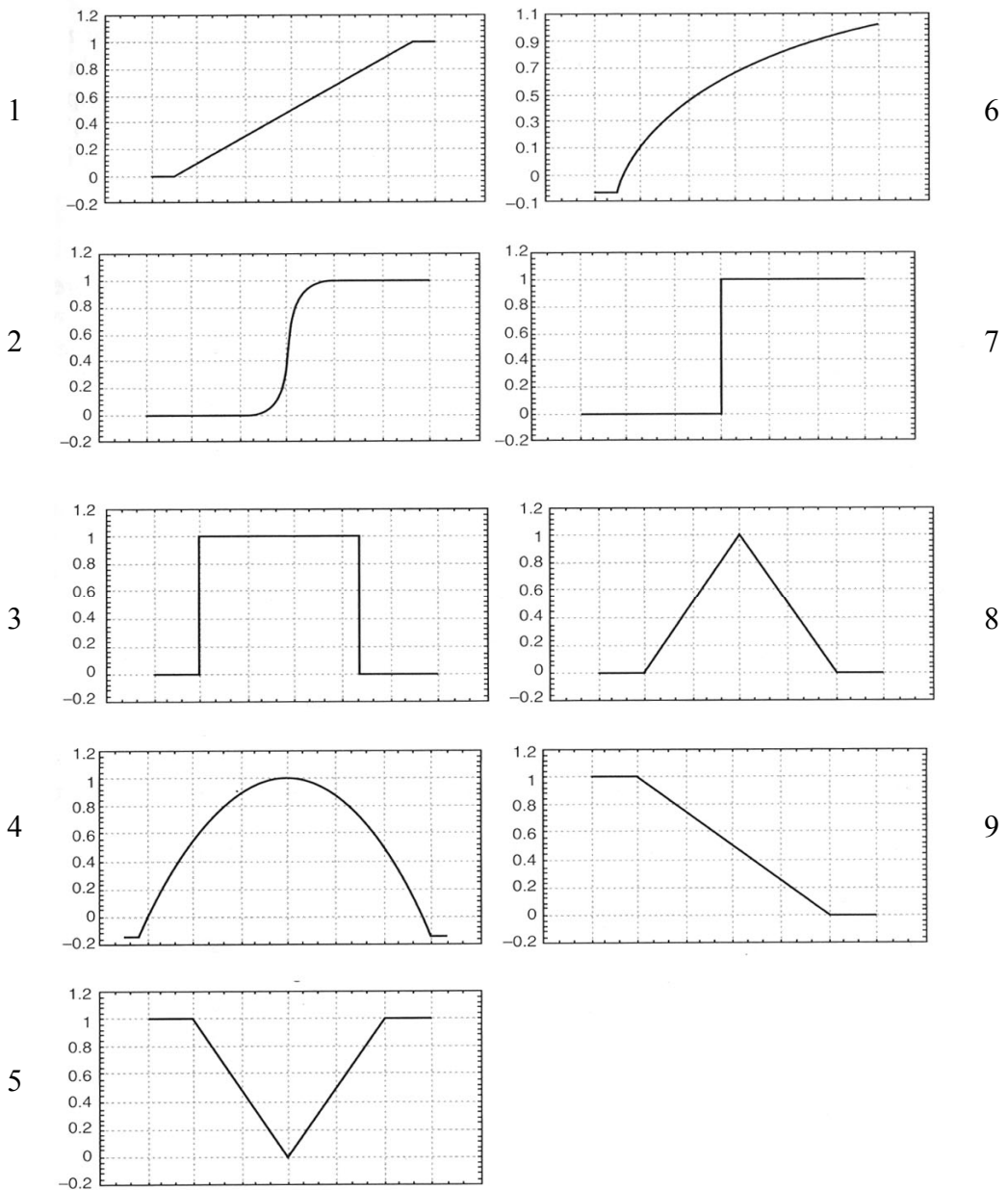


Figura 3.1 Gráfica de las funciones de utilidad.

Tabla 3.1

INTERVALOS NUMÉRICOS DE FUNCION DE UTILIDAD “FU”	
Valor de “FU”	Puntuación de la Función Utilidad
1,00 – 0,80	Excelente
0,80 – 0,63	Bueno
0,63 – 0,37	Aceptable – medio
0,37 – 0,20	Límite de aceptación
0,20 – 0,00	No aceptable

3.3 DISEÑO EXPERIMENTAL FACTORIAL FRACCIONARIO

El número de experimentos requerido para un diseño experimental factorial completo 2^k aumenta geométricamente a medida que k (variables) incrementa. Resulta sin embargo, que cuando k es grande, la información deseada puede ser a menudo obtenida representando solamente una fracción del diseño factorial completo.

En forma general un diseño fraccionario a dos niveles se representa por 2^{k-q} (Box G,375) donde “ k ” es el número de factores (variables) y “ q ” es el grado de fraccionamiento de la matriz del diseño factorial completo.

Si se tiene k factores, cada uno colocado a 2 niveles, un diseño experimental factorial completo tiene 2^k experimentos. Considerando un esquema a dos niveles en cinco variables, un diseño factorial completo requiere $2^5=32$ experimentos.

Tabla 3.2

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

Todos los efectos pueden ser calculados, pero esto no implica que todos sean de apreciable tamaño. En términos de magnitud absoluta, los efectos principales pueden ser más grandes que la interacción de dos factores, lo cual puede ser aún más grande que la interacción de tres factores y así en adelante.

Un diseño factorial fraccionario permite acelerar el estudio con una fracción de un diseño factorial 2^5 , permitiendo estimar los efectos confundidos entre las variables principales y las interacciones.

Por ejemplo un diseño factorial 2^5 requiere 32 experimentos. El experimentador ha escogido hacer solamente los 16 experimentos, denominado la mitad de la fracción, esto es a menudo designada como un diseño factorial fraccionario 2^{5-1} .

$$\frac{1}{2} 2^5 = 2^{-1} 2^5 = 2^5 2^{-1} = 2^{5-1}$$

En caso de fraccionar a la cuarta parte el diseño 2^5 , se tiene:

$$\frac{1}{4}2^5 = 2^{-2} 2^5 = 2^5 2^{-2} = 2^{5-2}$$

La notación nos dice que el diseño acopla cinco variables colocadas cada una a dos niveles pero que son empleados solamente $2^{5-1} = 16$ experimentos.

Tabla 3.3

NIVELES PARA LAS VARIABLES			
Variable	Nivel alto (+)	Nivel bajo (-)	Nivel central (0)
X ₁	1	-1	0
X ₂	1	-1	0
X ₃	1	-1	0
X ₄	1	-1	0
X ₅	1	-1	0

3.3.1 ANALISIS DE UN DISEÑO EXPERIMENTAL FACTORIAL

FRACCIONARIO 2^{5-1}

Cuando se fracciona una matriz se introducen o combinan variables puras con las interacciones, resulta así que, la variable pura se confunde con la interacción, generando “confusiones”. Para obtener esto se permite que el efecto de la variable sea igual al efecto de la interacción.

3.3.2 DETERMINACIÓN DE LAS CONFUSIONES EN EL DISEÑO EXPERIMENTAL FACTORIAL FRACCIONARIO

El diseño factorial fraccionario 2^{5-1} es construido de la siguiente forma:

1. Se escribe un diseño factorial 2^4 por las cuatro variables 1, 2, 3, 4.
2. Se escribe la columna de signos por las interacciones 1234 para definir los niveles de la variable 5 de tal forma que $5=1234$.

3.3.3 GENERADOR PARA DETERMINAR LAS CONFUSIONES

Este es generalizado a todos los casos utilizamos el concepto de generador, derivada de la teoría de los grupos.

El 2^{5-1} es construido al poner:

$$5 = 1234$$

Esta relación es llamada el generador del diseño. Multiplicando los dos lados por 5 donde se obtiene

$$5 * 5 = 1234 * 5$$

ó

$$5^2 = 12345$$

De este modo el generador del diseño puede ser escrito de manera equivalente:

$$I=12345$$

El Diseño factorial fraccionario es definido por un solo generador, así la relación $I = 12345$ también provee la definitiva relación del diseño. Esta relación es la llave para la confusión de las muestras. Por ejemplo, multiplicando esta relación en los dos lados por 1 produce:

$$I=2345$$

De similar forma multiplicando por 2 nos da $2=1345$ y así se producen todas las identidades.

En el ejemplo de arriba el generador $5=1234$ o equivalentemente $I=12345$ produce la relación definitiva para el diseño. En otras palabras, generando una nueva columna $5=1234$ obtenemos el factorial fraccionario correspondiente. La relación definitiva $I=12345$ dada por este generador produciendo inmediatamente la confusión de las muestras, entonces obtenemos el diseño factorial fraccionario correspondiente a un diseño completo 2^5 . Aplicando repetidamente el concepto de generador se puede resolver el problema de las confusiones.

Tabla 3.4

RELACIÓN ENTRE COLUMNAS Y CONFUSIONES		
Relación entre columnas pares	Confusión de muestras	
1=2345	I_1	1+2345
2=1345	I_2	2+1345
3=1245	I_3	3+1245
4=1235	I_4	4+1235
5=1234	I_5	5+1234
12=345	I_{12}	12+345
13=245	I_{13}	13+245
14=235	I_{14}	14+235
15=234	I_{15}	15+234
23=145	I_{23}	23+145
24=135	I_{24}	24+135
25=134	I_{25}	25+134
34=125	I_{34}	34+125
35=124	I_{35}	35+124
45=123	I_{45}	45+123
(I=12345)	$I_1 \rightarrow \text{promedio} + \frac{1}{2}(12345)$	

3.3.4 CONCEPTO DE RESOLUCIÓN DE UN DISEÑO

Un diseño de resolución “R” es uno en el cual ningún factor efecto es confundido con otro efecto conteniendo menos que “R-p” factor. La resolución de un diseño es

denotada por una letra romana puesta como un suscrito. De este modo se puede referir al diseño 2^{5-1} es de resolución “V”.

Un diseño de resolución $R=V$ no confunde los principales efectos e interacciones de dos factores con otras, pero si confunde interacciones de dos factores con interacciones de tres factores y así en adelante.

En general, puede ser demostrado que un diseño factorial fraccionario de resolución “R” contiene factoriales completos (posiblemente repetidos) en cada set de variables “R-1”. Supongamos, entonces que el experimentador tiene un mínimo de variables pero cree que todo “R-1” de ellos (identidad específica desconocida) puede tener efectos no detectables. Entonces, si el experimentador utiliza un esquema de resolución “R” y su conjetura es justificada él tendrá un diseño factorial en las variables efectivas.

Esta idea se ilustra en el subespacio de tres dimensiones con el esquema de un diseño fraccionario 2^{3-1} , en el cual proyecta un diseño factorial 2^2 .

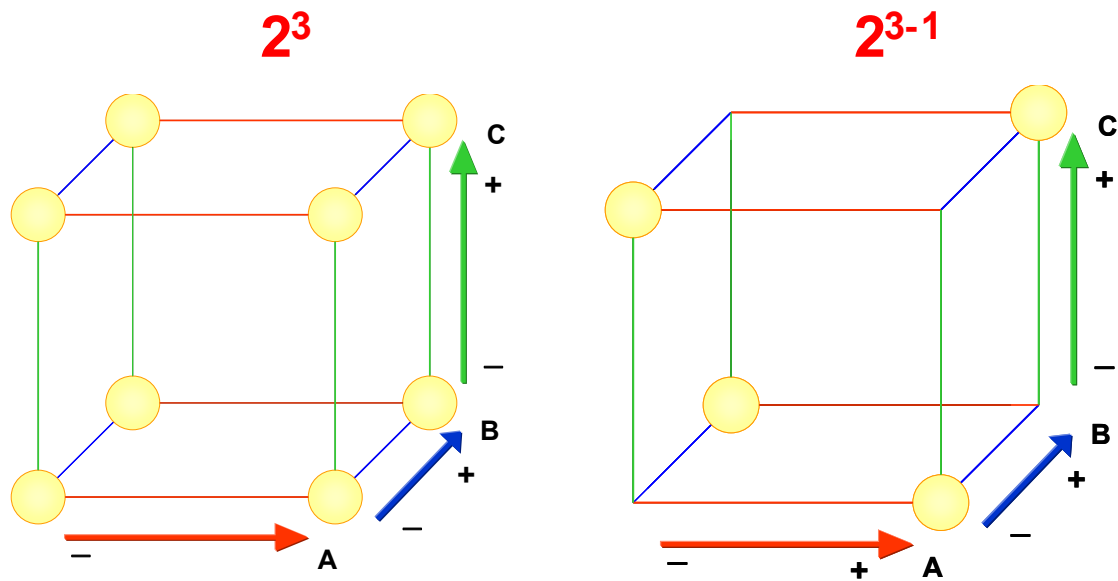


Figura 3.2 Esquema ortogonal del diseño factorial completo y fraccionario

3.3.5 DISEÑO FOLD-OVER EN LOS PRINCIPALES EFECTOS DE CONFUSIÓN CON INTERACCIÓN DE DOS VARIABLES

El Fold-over es una técnica que permite aislar los efectos, que en un diseño factorial fraccionario se encuentra la resolución de todos los principales efectos de confusión con la interacción de 2 variables.

Esta fracción es obtenida por el cambio de signos de todo el experimento poniendo de las variables del primer diseño.

Tabla 3.5

MATRIZ DE DISEÑO FACTORIAL FRACCIONARIO						
No Experimento	I	1(2*4) (3*5)	2(1*4)	3(1*5)	4(1*2)	5(1*3)
1	1	+1	+1	+1	-1	-1
2	1	-1	+1	+1	+1	+1
3	1	+1	-1	+1	+1	-1
4	1	-1	-1	+1	-1	+1
5	1	+1	+1	-1	-1	+1
6	1	-1	+1	-1	+1	-1
7	1	+1	-1	-1	+1	+1
8	1	-1	-1	-1	-1	-1

Tabla 3.6

FOLD OVER DE LA MATRIZ DEL DISEÑO FRACCIONARIO						
No Experimento	I	1(-2*4) (-3*5)	2(-1*4)	3(-1*5)	4(-1*2)	5(-1*3)
1	1	-1	-1	-1	+1	+1
2	1	+1	-1	-1	-1	-1
3	1	-1	+1	-1	-1	+1
4	1	+1	+1	-1	+1	-1
5	1	-1	-1	+1	+1	-1
6	1	+1	-1	+1	-1	+1
7	1	-1	+1	+1	-1	-1
8	1	+1	+1	+1	+1	+1

3.4 DETERMINACIÓN DEL MODELO DE RESPUESTA

El modelo de respuesta se lo obtiene mediante el cálculo de los coeficientes y efectos significativos de cada variable del diseño y de sus respectivas interacciones. A

continuación se presentará el método que utiliza la regresión de mínimos cuadrados multivariante.

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

(3.4)

Y	X						b	e
Y_1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	b_0	e_1
Y_2	+1	+1	-1	-1	-1	-1	b_1	e_2
Y_3	+1	-1	+1	-1	-1	+1	b_2	e_3
Y_4	+1	+1	+1	-1	+1	-1	b_3	e_4
Y_5	+1	-1	-1	+1	+1	-1	b_4	e_5
Y_6	+1	+1	-1	+1	-1	+1	b_5	e_6
Y_7	+1	-1	+1	+1	-1	-1	b_6	e_7
Y_8	+1	+1	+1	+1	+1	+1	b_7	e_8
Y_9	+1	+1	+1	+1	-1	-1	b_8	e_9
Y_{10}	+1	-1	+1	+1	+1	+1	b_9	e_{10}
Y_{11}	+1	+1	-1	+1	+1	-1	b_{10}	e_{11}
Y_{12}	+1	-1	-1	+1	-1	+1	b_{11}	e_{12}
Y_{13}	+1	+1	+1	-1	+1	+1	b_{12}	e_{13}
Y_{14}	+1	-1	+1	-1	+1	-1	b_{13}	e_{14}
Y_{15}	+1	+1	-1	-1	+1	+1	b_{14}	e_{15}
Y_{16}	+1	-1	-1	-1	-1	-1	b_{15}	e_{16}

De esta matriz de Diseño Factorial Fraccionario con su respectivo Fold-Over y el vector respuestas, se obtienen los coeficientes para cada variable e interacciones mediante

aplicación de regresión de mínimos cuadrados multivariante (Box G,379), aplicando la siguiente ecuación:

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

(3.5)

$$b = \frac{1}{n} \cdot I_n \cdot X^T \cdot Y = \frac{1}{n} \cdot X^T \cdot Y$$

(3.6)

Existe otra manera de realizar el cálculo para obtener los coeficientes de las variables, y es la siguiente:

$$I = \frac{Y_1 + Y_2 + Y_3 + Y_4 + Y_5 + Y_6 + Y_7 + Y_8 \dots Y_n}{n} = b_0$$

$$X_1 = \frac{-Y_1 + Y_2 - Y_3 + Y_4 - Y_5 + Y_6 - Y_7 + Y_8 \dots Y_n}{n} = b_1$$

3.5 ESTIMACIÓN DE LOS EFECTOS SIGNIFICATIVOS

En el diseño experimental se procede al estudio estadístico de la significatividad de los factores. Los efectos de las variables coinciden con el DOBLE de los coeficientes (b_j) de los mismos en la regresión. La calidad de los parámetros del modelo se calcula mediante el error experimental de la matriz de dispersión a partir de la incertidumbre experimental.

$$U \exp\left(\frac{\alpha}{2}, g.l.\right) = t\left(\frac{\alpha}{2}, g.l.\right) \cdot \sigma \cdot \sqrt{c^{jj}}$$

(3.7)

“U exp” es la incertidumbre experimental calculada con el test t-student, con probabilidad de error de primer orden de $\alpha/2$ y grados de libertad (g.l.) igual a “n-1” obtenidas con “n” número de replicas al punto central del diseño experimental; c^{jj} es la raíz de los elementos de la diagonal de la matriz $(X^T \cdot X)^{-1}$ y que es $1/n$; donde “n” es el número de experimentos corridos.

Una vez calculado los efectos de las variables y sus interacciones, tenemos que establecer cuales de éstas son diferentes de CERO, es decir ser mayores a la incertidumbre experimental. Así:

Variable significativa en el modelo experimental

$$2b_j > U \exp\left(\frac{\alpha}{2}, g.l.\right) \quad (3.8)$$

Variable no significativa en el modelo experimental

$$2b_j < U \exp\left(\frac{\alpha}{2}, g.l.\right) \quad (3.9)$$

3.4.1.2 HALF-NORMAL PLOT

Existe también el método gráfico para determinar las variables relevantes para el modelo, éste es conocido como “Half-Normal Plot”. En este los coeficientes que no son significativos se encuentran distribuidos casualmente sobre una recta, mientras que los coeficientes significativos están ubicados fuera de la recta.

Para el desarrollo de este método se determina los coeficientes de las variables, los que se ordenan de menor a mayor, se cuenta el número de coeficientes y se divide en un intervalo de 1-100 o 0-1. La probabilidad para cada variable es igual $(1-1/2)/\text{Num. Factores}$, $(2-1/2)/\text{Num. Factores}$, $(3-1/2)/\text{Num. Factores}$, y así en adelante.

Tabla 3.7

HALF-NORMAL PLOT		
		Cálculo
Coefficientes	Probabilidad	Probabilidad
0.0030	7.1429	$(1-1/2)/7$
0.0034	21.4286	$(2-1/2)/7$
0.0044	35.7143	$(3-1/2)/7$
0.0080	50.0000	$(4-1/2)/7$
0.0089	64.2857	$(5-1/2)/7$
0.0244	78.5714	$(6-1/2)/7$
0.0783	92.8571	$(7-1/2)/7$

Para definir las variables significativas para el modelo graficamos el valor de los coeficientes en las abscisas contra la probabilidad en la ordenada. Una vez graficados los puntos se procede a trazar una recta entre los puntos con mayor pendiente, los cuales definen la recta; así nos permite identificar los coeficientes distantes de la recta y por consiguiente los factores o variables relevantes en el modelo.

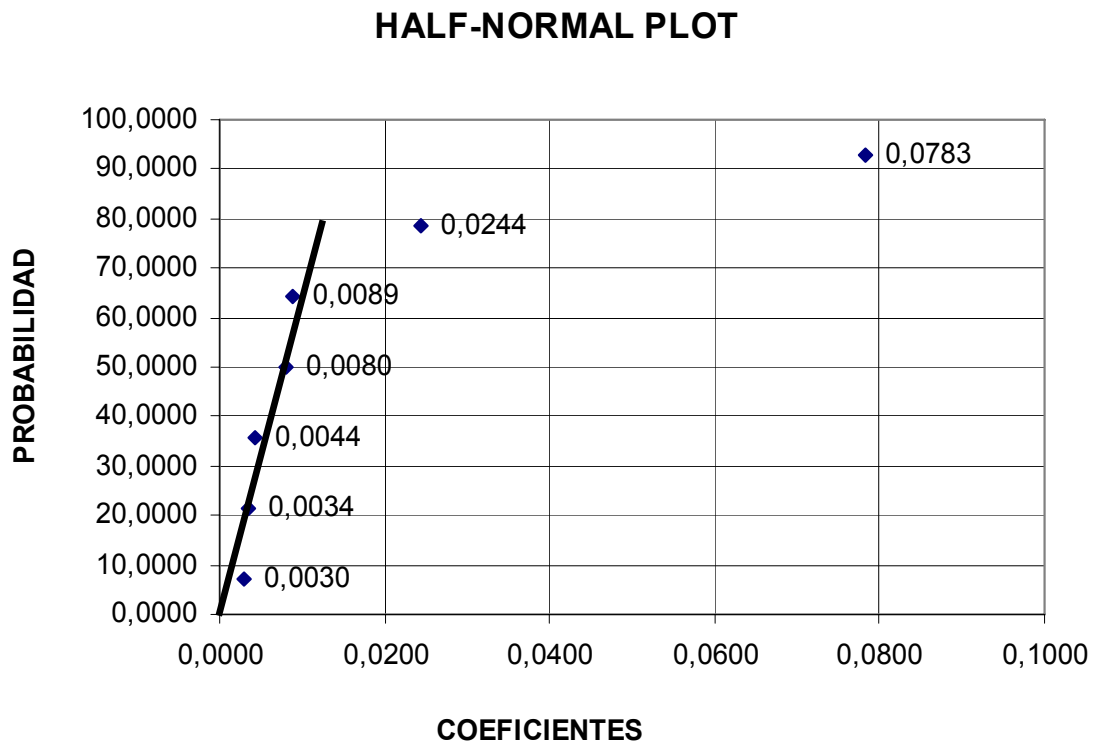


Figura 3.3 Half-Normal Plot de los coeficientes de las variables

3.5 OPTIMIZACIÓN: MÉTODO DE SUPERFICIE DE RESPUESTA

Desde una visión general, optimizar un alimento implica el ajuste de diversas condiciones operativas del proceso que se utiliza para fabricarlo; igualmente implica la determinación de las cantidades de materias primas que favorezcan su elaboración, mejorar su gusto, etc., por aquello, se cuantifican las respuestas de la variable en

estudio, por ejemplo, sabor, rendimiento, etc.; a las modificaciones introducidas en cierto número de variables experimentales. Por ejemplo, puede optimizarse los niveles de materias primas de modo que el fin sea conseguir mayor aceptabilidad entre los consumidores; por lo tanto requiere que se mida sensorialmente la aceptación del alimento (Alvarado J,173).

En la etapa preliminar de una investigación se realizan tanteos que consisten en efectuar pruebas, a menudo, de contenido semicuantitativo con el propósito de ubicar el espacio operatorio que se define mediante la magnitud de las variables independientes que se incluyen en la investigación. El propósito que se persigue es de alcanzar el nivel óptimo en la obtención del resultado que se pretende conseguir. Al respecto, la metodología consiste en optimizar la respuesta y/o rendimiento que depende de los niveles de una o más variables cuantitativas. La respuesta o rendimiento es una variable cuantitativa continua (rendimiento de un proceso de síntesis, la pureza de un producto obtenido mediante un proceso químico o bioquímica, etc.) Y el rendimiento medio o promedio es una función desconocida de los niveles de las variables o factores independientes, tales como, la temperatura, la presión, la concentración y pureza de los reactivos, etc. La respuesta o rendimiento promedio en función de las combinaciones de los tratamientos conduce a trazar curvas de contorno que representan los rendimientos obtenidos en función de las variables independientes o puede conducir a construir una superficie denominada superficie de respuesta de dimensiones $p+1$ donde “p” es el número de factores o variables independientes que se incluyen en el experimento.

Con el fin de alcanzar el rendimiento máximo o en ciertos casos el rendimiento mínimo, es parte de la etapa inicial de la investigación utilizar un modelo de regresión de primer

orden que, en general, conduce a una adecuada aproximación hacia el nivel óptimo de rendimiento que interesa localizarlo.

El método de ascenso máximo o mínimo, dependiendo del propósito de la investigación, permite secuencialmente localizar el nivel máximo de respuesta dependiente del nivel de cada una de las variables o factores que definen el rendimiento del proceso bajo la investigación.

Para el número “p” de factores, el modelo es una ecuación polinómica de la forma:

$$Y = b_0 + \sum b_i X_i + \dots + \sum b_{ij} X_i X_j + \dots + \sum b_{ii} X_i^2 + \dots$$

(3.10)

3.5.1 DISEÑO CENTRAL COMPUESTO

Para encontrar el punto máximo de las respuestas se utiliza una función de segundo orden que se construirá mediante el siguiente diseño central compuesto para tres factores.

Este diseño está constituido de tres partes:

1. Diseño factorial completo.
2. Réplicas al punto central.
3. Experimentos distribuidos simétricamente respecto a los ejes de los factores a una distancia $\pm \alpha$ del centro.

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

(3.11)

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

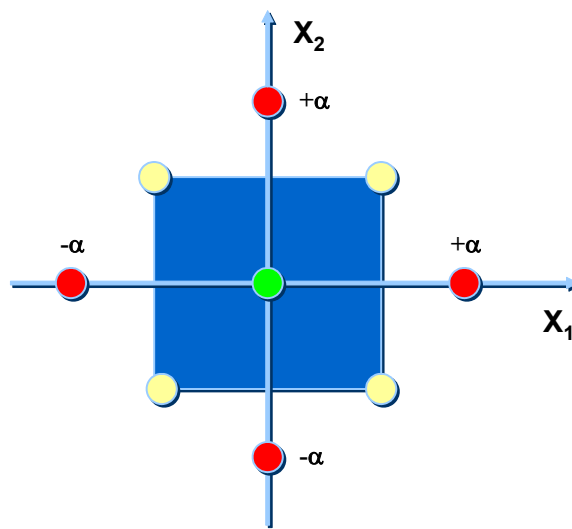


Figura 3.4 Esquema Gráfico del Diseño Factorial Central Compuesto.

Tabla 3.8

DISEÑO FACTORIAL CENTRAL COMPUESTO A DOS NIVELES Y DOS FACTORES							
	I	X ₁	X ₂	X ₁ X ₂	X ₁ ²	X ₂ ²	Y
Puntos Factoriales	+1	-1	-1	+1	1	1	Y ₁
	+1	+1	-1	-1	1	1	Y ₂
	+1	-1	+1	-1	1	1	Y ₃
	+1	+1	+1	+1	1	1	Y ₄
	+1	-1	-1	+1	1	1	Y ₅
	+1	+1	-1	-1	1	1	Y ₆
	+1	-1	+1	-1	1	1	Y ₇
	+1	+1	+1	+1	1	1	Y ₈
Puntos Axiales	+1	-1.414	0	0	1.999	0	Y ₉
	+1	1.414	0	0	1.999	0	Y ₁₀
	+1	0	-1.414	0	0	1.999	Y ₁₁
	+1	0	1.414	0	0	1.999	Y ₁₂
Punto central (Réplicas)	+1	0	0	0	0	0	Y ₁₃
	+1	0	0	0	0	0	Y ₁₄
	+1	0	0	0	0	0	Y ₁₅
	+1	0	0	0	0	0	Y ₁₆

Se calcula nuevamente los coeficientes de las variables y sus respectivas interacciones con la ecuación (3.5) para obtener el polinomio completo del modelo de superficie de respuesta.

$$Y = b_0 + \sum b_i X_i + \dots + \sum b_{ij} X_i X_j + \dots + \sum b_{ii} X_i^2 + \dots$$

3.5.2 OBTENCIÓN DE LA GRÁFICA DE SUPERFICIE POLINOMIAL

La construcción de la superficie de respuesta o mapas de contorno depende del modelo de regresión y de su complejidad; el modelo más simple es el caso de un modelo de primer orden con dos variables trabajadas a 3 puntos.

Dependiendo de las situaciones en estudio las superficies de respuesta pueden presentar picos de máxima respuesta, concavidades, convexidades o incluso llegar a tener forma de ensilladura. El análisis cuidadoso de estas gráficas lleva a determinar los puntos óptimos.

Para elaborar la gráfica de superficie de respuesta se puede utilizar varios softwares disponibles como herramienta, entre ellos los más relevantes son el Modde, Statistica, MatLab, etc., generando gráficos similares al siguiente:

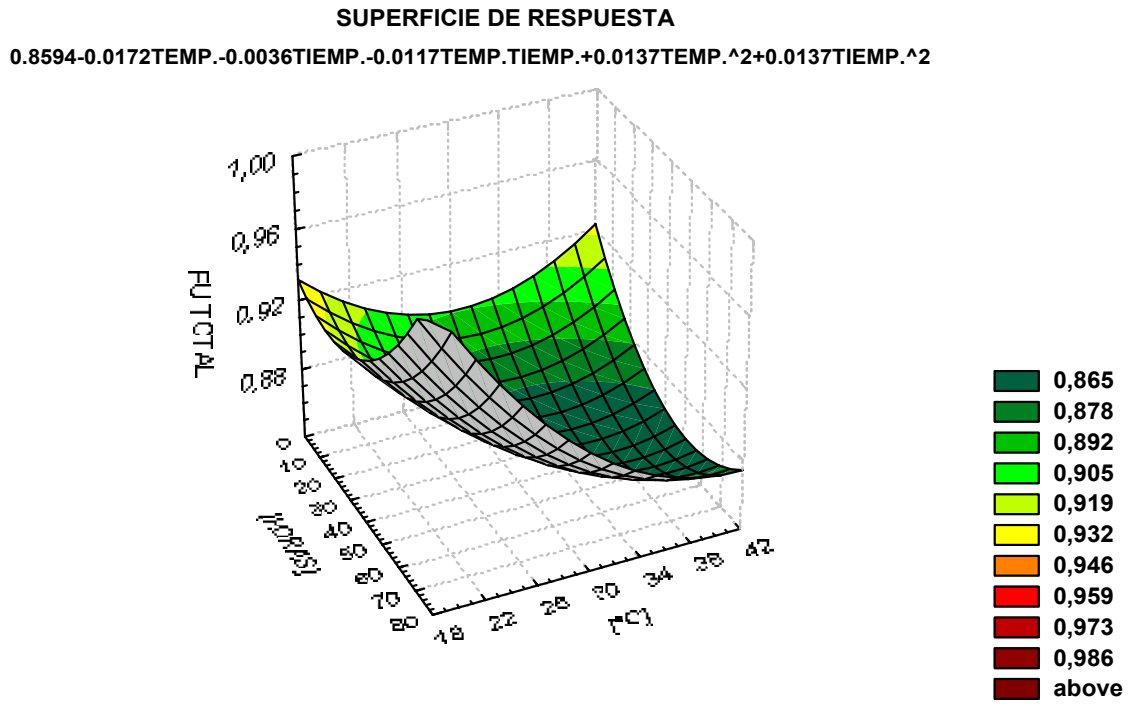


Figura 3.5 Modelo de superficie de respuesta polinomial cuadrática

CAPÍTULO IV

METODOLOGÍA Y

DESARROLLO EXPERIMENTAL

4.1 METODOLOGÍA

Esta tesis de grado se la ha dividido en tres secciones, obedeciendo así a las etapas fundamentales del diseño experimental; de la siguiente manera:

1. Selección de las variables: aquí se realiza una selección inicial de las variables que serán estudiadas de una manera rápida; estas son: a) Temperatura de cuajado, b) Actividad enzimática del cuajo, c) Tiempo de cuajado, d) Presión de prensado, e) Tiempo de maduración.
2. Etapa exploratoria “Screening”: de las variables propuestas en el paso primero, se define su influencia y relevancia en función de la calidad gustativa del queso de cabra. Aquí se aplica la matriz de un diseño experimental factorial fraccionario a 2 niveles y 5 variables, así: 2^{5-2} .
3. Etapa de optimización y selección de la máxima respuesta: para la optimización se aplica un diseño experimental factorial completo a 2 niveles para 2 variables (las cuales fueron definidas en la etapa exploratoria). Una vez definido el mejor campo de trabajo de las variables, y apoyándonos en el software MODDE,

obtendremos el punto de máxima respuesta y los valores respectivos para cada variable en sus unidades reales.

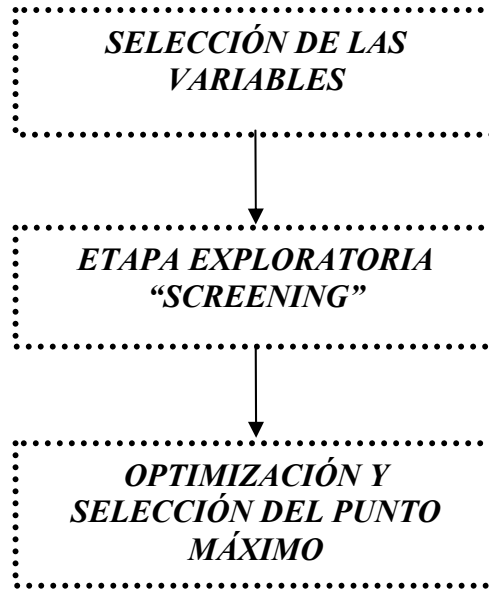


Figura 4.1 Diagrama de trabajo experimental

4.2 SELECCIÓN DE LAS VARIABLES

4.2.1 DIAGRAMA DE PROCESO PARA ELABORACIÓN QUESO FRESCO

Como materia prima fundamental se utilizó leche de cabra ordeñada e inmediatamente refrigerada, de tal forma que sea aprovechable la flora Láctea presente normalmente en la leche. El cuajado se realizó en un baño maría con control regulable de temperatura y utilizando recipientes de acero inoxidable; para cada experimento se empleó 2000 [ml] de leche. La coagulación se la obtuvo con adición o no de agente coagulante (quimosina) (Scholz W,26) y a la temperatura definida para cada experimento según la