

UTILIZACIÓN DE SUERO ÁCIDO LÁCTEO EN LA ELABORACIÓN DE DULCE DE LECHE CON PROBIÓTICOS

Por

Gladys Del Socorro Tapie Canacuan

Tesis sometida en cumplimiento parcial de los requisitos para el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

En

CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO

Recinto Universitario de Mayagüez

Colegio de Ciencias Agrícolas

2013

Aprobado por:

Leyda Ponce de León, Ph.D.
Presidente, Comité Graduado

Fecha

Edna Negrón, Ph.D.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Fernando Pérez, Ph.D.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Miriam J. Nieto, Ph.D.
Representante de Estudios Graduados

Fecha

Edna Negrón, Ph.D.
Coordinadora
Programa de Ciencia y Tecnología de Alimentos

Fecha

Derechos de Autor Reservados ©
Gladys Del Socorro Tapie Canacuan
2013

ABSTRACT

One of the major problems facing today's dairy industry is the disposal of whey; this is due to the high content of organic materials, mostly lactose, which represents an environmental problem. Environmental regulatory agencies require the dairy industry to develop alternatives to dispose of acid whey.

The aim of this study was to use the whey acid in the development of Dulce de Leche with probiotics and determine how they affect the physicochemical characteristics of traditional Dulce de Leche. We developed Dulce de Leche with formulation of 100%, 75%, 50% and 0% whey and / or lactose-free milk by 40%, was added guar gum proportion to the content of whey and was stored at 25 °C. Proximate analysis of the characterization of the product and sensory analysis to determine the most preferred. *Lactobacillus casei* was added to the treatment most preferred by consumers (75% serum).

These tests were conducted for the formulation of proximal texture analysis (hardness, adhesiveness, cohesiveness and viscosity), color, pH, aw, Brix and microbiological count (final product chosen in the sensory panel) of molds, yeasts, coliforms, and lactic acid bacteria (*Lactobacillus casei*), was stored at 15 °C and 4 °C. It was found that in the treatments with higher levels of whey the color is darker and higher in moisture, protein adhesion, hardness and viscosity is lower.

In other panelists perceived the grittiness present in all samples analyzed. The sample with *Lactobacillus casei*, the physicochemical characteristics such as protein, moisture, fat, ash, pH and color (L, Hue, and Saturation) remains unchanged. The viscosity increases during storage, due to the clumping phenomenon was evident at 25 °C in 30 days of storage and

temperature are retarded 15 °C (80 days) and 4 °C. *Lactobacillus casei*, adapts and survives easily throughout the storage period (80 days) to 15 °C and 4 °C with counts of 10^8 and 10^9 CFU/g, respectively, on day 0 and 106 CFU/g at day 80.

However, the best storage temperature for the growth and survival of *Lactobacillus casei* was at 4 °C. no occurrence of molds was observed (<10 CFU/g), yeast (<10 CFU/g) and coli forms (<10 CFU/g), so it is considered that the Dulce de Leche is a stable food aw around 0.78 ± 0.3 . This study demonstrates that making Dulce de Leche is a possible alternative to reduce the problem of acid whey available and able to satisfy the demand for functional products.

RESUMEN

Uno de los grandes problemas que hoy día enfrenta la industria lechera es la disposición de suero, esto se debe al alto contenido de material orgánica, mayormente lactosa, que representa un problema ambiental. Las agencias reguladoras del ambiente exigen a la industria lechera el desarrollar alternativas para disponer del suero ácido. El objetivo de este estudio fue utilizar el suero ácido en la elaboración de Dulce de Leche con probióticos y determinar cómo afectan las características fisicoquímicas del Dulce de Leche tradicional. Se elaboró Dulce de Leche con formulación del 100%, 75%, 50% y 0% suero y/o leche deslactosada en un 40%, se adicionó goma agar proporcionalmente al contenido de suero y se almacenó a 25°C, se realizó análisis proximal para caracterizar el producto y análisis sensorial para determinar la mayor preferencia. Se adicionó *Lactobacillus casei*, al tratamiento de mayor preferencia por el consumidor (75% suero). A estas formulaciones se les realizó análisis proximal, análisis de textura (dureza, adhesividad, cohesividad y viscosidad), color, pH, aw, grados Brix y conteo microbiológico (producto final escogido en el panel sensorial) de mohos, levaduras, coliformes, y bacteria ácido lácticas (*Lactobacillus casei*), se almacenó a 15°C y 4°C. Se obtuvo que en los tratamientos con mayor contenido de suero el color es más oscuro y la humedad, proteínas adhesividad, dureza y viscosidad es menor. Además los panelistas percibieron la presencia de arenosidad en todas las muestras analizadas. La muestra con *Lactobacillus casei*, las características fisicoquímicas como proteínas, humedad, grasa, ceniza, pH y color (L, Matiz, Saturación) no se altera. La viscosidad aumenta durante almacenamiento, debido a la formación de grumos este fenómeno fue evidente a 25°C en 30 días de almacenamiento y se retarda a temperatura 15°C (80 días) y 4°C. *Lactobacillus casei*, se adapta y sobrevive con facilidad durante todo el tiempo de

almacenamiento (80 días) A 15°C y 4°C con recuentos de 108 y 109 UFC/g, respectivamente, en el día 0 y 106 UFC/g al día 80. Sin embargo, la mejor temperatura de almacenamiento para el crecimiento y sobrevivencia de *Lactobacillus casei* fue a 4°C. no se observó presencia de mohos (<10 UFC/g), levaduras (<10 UFC/g) y coliformes (<10 UFC/g), por lo que se considera que el Dulce de Leche es un alimento estable con a_w alrededor de 0.78 ± 0.3 . Este estudio demuestra que la elaboración de dulce de leche es una posible alternativa para reducir el problema de disposición de suero ácido y lograr satisfacer la demanda de productos funcionales.

Dedicatoria

A Dios, por darme la vida y por siempre estar con migo “Porque yo, el Señor tu Dios, te he tomado de la mano; yo te he dicho: No tengas miedo, yo te ayudo”. Isaías 41:13.

A mis padres y mi hermano que me han brindado su apoyo incondicional en todas las etapas de mi vida

A mi esposo, gracias por tu apoyo, ayuda y comprensión

A mis amigos y profesores por los consejos y colaboración

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer primeramente a Dios, porque sin El nada de esto fuese posible, por ser mi fuerza, mi guía, mi esperanza, mi amigo y ayudador a lo largo de todas las etapas de mi vida, sin su presencia en mi vida no habría podido avanzar.

Agradezco a mis padres José Fernando Tapie y María Rosario Canacuan por sus oraciones, apoyo, consejos y sabiduría les agradezco a ambos, por creer en mí y brindarme un amor incondicional. A mis hermanos Doris, Iván, Armando y Amanda por su apoyo.

Quiero agradecer a mi esposo William Gabriel Alpala, por creer en mí y brindarme su apoyo, amor, motivación y por estar siempre disponible a ayudarme, sin ti los retos que tuve que pasar hubieran sido más difíciles de llevar.

A mi directora de tesis, la Dra. Leyda Ponce de León, gracias por sus buenos consejos, asesoría, amistad, apoyo incondicional y por motivarme a continuar y terminar este trabajo. Eres una excelente persona, Dios te bendiga siempre.

Al Doctor Fernando Pérez por su amistad, guía, consejo, paciencia y disponibilidad durante el desarrollo de esta tesis.

A la Dra. Edna Negrón por su consejo y apoyo durante todo este tiempo.

A la estudiante graduada Ana Raquel Cameron Soto del Departamento Ingeniería Química, del laboratorio de fluidos del RUM por su ayuda, disponibilidad y su gran colaboración en la determinación de viscosidad.

A la Dra. Ivellis Padilla por su amistad, confianza, apoyo y darme la oportunidad de trabajar el departamento de química.

A la Profesora Verónica Sánchez por su amistad, apoyo, confianza, buenos consejos y permitirme trabajar en el departamento de química.

Quiero agradecer a mis amigos y compañeros en especial a Ángela Buitrago y Erika Zambrano, por siempre estar allí cuando más las necesite, por escucharme, apoyarme y ser incondicionales. A Diana Villamil, Nayda Meléndez, Jennifer Langrod y Edmarie Román, por su gran amistad y a José David Arecentales por su compañía y siempre regalarme una hermosa sonrisa que me hacía salir de la rutina.

Al Programa de Ciencia y Tecnología de Alimentos por proveer las facilidades del laboratorio de química, sensorial y microbiología de alimentos.

Al departamento de industrias pecuarias por el uso del laboratorio de productos lácteos.

A la hermandad colegial de avivamiento (HCA) de la UPRM, por su amistad, acogimiento, oraciones, retiros (todos fueron excelentes) y apoyo espiritual, por representar un respiro entre el trabajo de la universidad.

TABLA DE CONTENIDO

Abstract	¡Error! Marcador no definido.
Resumen.....	¡Error! Marcador no definido.
Agradecimientos	viii
Lista de Tablas	xiv
Lista de Figuras.....	xvi
Lista de Gráficas	xvii
INTRODUCCIÓN	1
1. OBJETIVOS.....	4
1.1. Objetivo principal.....	4
1.2. Objetivos específicos.....	4
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 Dulce de leche	5
2.2. Suero lácteo	12
2.2.1. <i>Composición del suero</i>	13
2.2.2. <i>Usos del suero lácteo</i>	15
2.3. Lactosa.	17
2.4. Probióticos.....	21
2.5. Goma agar	24
2.5.1. <i>Gelificación de agar.</i>	25
3. MATERIALES Y MÉTODOS	26
3.1. Materia prima: suero lácteo ácido	26
3.1.1. <i>Estandarización del suero ácido y la mezcla suero/leche</i>	26
3.2. Hidrólisis de lactosa.	27
3.3. Elaboración del dulce de leche.....	28

3.3.1. Dosificación de suero ácido y leche	28
3.3.2. Adición de goma.	29
3.3.3. Selección del probiótico	30
3.3.4. Curva de crecimiento de <i>Lactobacillus casei</i>	31
3.3.5. Activación y recuperación del probiótico.	31
3.3.6. Inoculación del dulce de leche	32
3.4. Análisis proximal de los cuatro tratamientos de dulce de leche	32
3.4.1. Determinación de humedad.	32
3.4.2. Determinación de cenizas.....	33
3.4.3. Determinación proteína.....	33
3.5. Análisis físico químico	35
3.5.1. Determinación de color.	35
3.5.2. °Brix.....	36
3.5.3. pH	36
3.5.4. Actividad del agua (a_w).....	36
3.5.5. Perfil de Textura.....	37
3.5.6. Viscosidad.....	37
3.6. Análisis microbiológico	37
3.6.1. Enumeración de bacterias ácido lácticas en medio MRS	37
3.6.2. Enumeración de mohos y levaduras en medio PDA.....	38
3.6.3. Enumeración de mesófilos en medio PCA.....	38
3.6.4. Enumeración de coliformes totales en medio VRBA.....	39
3.7. Análisis sensorial.....	39
3.7.1. Preparación de las muestras	39
3.7.2. Procedimiento de la prueba	39

3.8. Análisis de datos.....	40
4. RESULTADOS Y DISCUSIONES	41
4.1. Hidrólisis de lactosa	41
4.2. Análisis proximal de dulce de leche de los cuatro tratamientos.	45
4.2.1. <i>Humedad</i>	45
4.2.2. <i>Proteína</i>	46
4.2.3. <i>Grasa</i>	47
4.2.4. <i>Ceniza</i>	48
4.2.5. <i>Carbohidratos</i>	49
4.3. Perfil fisicoquímico de los cuatro tratamientos del dulce de leche	50
4.3.1. <i>Análisis de color</i>	50
4.3.2. <i>°Brix</i>	54
4.3.3. <i>pH</i>	56
4.3.4. <i>a_w</i>	57
4.3.5 <i>Análisis de textura</i>	59
4.4. Análisis sensorial.....	66
4.5. Análisis dulce de leche con <i>Lactobacillus casei</i>	69
4.5.1. <i>Análisis proximal de dulce de leche Lactobacillus casei</i>	70
4.5.1.1. <i>Humedad</i>	70
4.5.1.2. <i>Ceniza</i>	71
4.5.1.3. <i>Grasa</i>	72
4.5.1.4. <i>Proteína</i>	72
4.5.1.5. <i>Carbohidratos</i>	73
4.5.2. Análisis del perfil de color.....	73
4.5.3. <i>°Brix</i>	78

4.5.4. pH	79
4.5.5. a_w	81
4.5.6. Análisis del perfil de textura.....	82
4.5.6.4. Viscosidad.....	87
4.6. Análisis microbiológico en dulce de leche.....	89
4.6.1. Análisis sobrevivencia <i>Lactobacillus casei</i>	89
4.6.2. Recuento de hongos, levaduras y coliformes.....	92
6. CONCLUSIONES.....	96
7. RECOMENDACIONES	98
8. BIBLIOGRAFÍA.....	99
9. APÉNDICE.....	108
9.1. Propiedades de suero, leche y mantequilla utilizada en la elaboración de dulce de leche.....	108
9.2. Características Físico químicas de la goma Agar Agar 100-44 HG	108
9.3. Determinación de la curva de crecimiento de <i>Lactobacillus casei</i>	109
9.4. Análisis estadístico	110
9.4.2. Análisis proximal dulce de leche con probióticos en base húmeda	116
9.4.3. Análisis proximal en base seco de dulce de leche con probióticos	120
9.4.4. Análisis fisicoquímico de los cuatro tratamientos de dulce de leche	122
9.4.5. Análisis proximal de los cuatro tratamientos dulce de leche.....	130
9.4.5. Análisis sensorial	132
9.5. Prueba de análisis sensorial.....	133
9.5.1. Hoja del panelista.	133
9.5.3. Carta de comité de protección a seres humanos	135
9.6. Determinación de la crioscopia en la leche y suero ácido.....	136

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Requisitos Fisicoquímicos que rigen el Dulce de Leche según el País.....	10
Tabla 2. Requisitos Microbiológicos para el Dulce de Leche.	11
Tabla 3. Composición del suero lácteo.	14
Tabla 4. Densidad, viscosidad e índice de refracción de la lactosa en función de la concentración. .	20
Tabla 5. Porcentaje de hidrólisis de la lactosa.	43
Tabla 6. Análisis de las cuatro formulaciones del dulce de leche parcialmente sustituido por suero.	44
Tabla 7. Estadística del análisis proximal a los cuatro tratamientos de dulce de leche elaborado con suero en base húmeda.....	46
Tabla 8. Análisis del color de los cuatro tratamientos del dulce de leche a base elaborado con suero.	52
Tabla 9. Interacción tratamiento tiempo del análisis estadístico de L, Matiz (°H) y Saturación (C _{ab})	52
Tabla 10. Perfil químico de los cuatro tratamientos del dulce de leche.....	55
Tabla 11. Perfil de textura (TPA) de los cuatro tratamientos de dulce del leche a base de suero ácido	65
Tabla 12. Análisis sensorial del dulce de leche, cuatro tratamientos.	67
Tabla 13. Análisis proximal del dulce de leche 75% suero, 25% leche con <i>Lactobacillus casei</i> . P = con probiótico, C = sin probiótico.....	70
Tabla 14. Perfil del color de dulce de leche 75 % suero, 25% leche con <i>Lactobacillus casei</i> . P = 75% suero, y 25% leche con probiótico, C = 75% suero, y 25% leche sin probiótico.....	75
Tabla 15. Perfil químico del dulce de leche 75% suero, 25% leche con <i>Lactobacillus casei</i> . P = con probiótico, C = sin probiótico.....	81
Tabla 16. Perfil de textura del dulce de leche 75 % suero, 25% leche con <i>Lactobacillus casei</i> . P = con probiótico, C = sin probiótico.....	83

Tabla 17. Viscosidad del dulce de leche 75% suero, 25% leche con <i>Lactobacillus casei</i> . P = con probiótico, C = sin probiótico.....	89
Tabla 18. Análisis microbiológico de hongos, levaduras, mesófilos y coliformes en dulce de leche con suero 75% y 25% leche con <i>Lactobacillus casei</i> . P = con probiótico, C = sin probiótico. ...	95
Tabla 19. Propiedades de la materia prima utilizada.	108
Tabla 20. Información nutricional de tic Pretested® Agar Agar 100-44 HG	108
Tabla 21. Datos de crecimiento de <i>Lactobacillus casei</i> en caldo MRS a 35°C, a 600nm.....	109
Tabla 22. Comentarios de los panelistas del análisis sensorial.....	134
Tabla 23. Medidas del punto crioscópico en suero ácido	136
Tabla 24. Medidas del punto crioscópico en leche	137
Tabla 26. Tabla nutricional del dulce de leche con suero ácido con probióticos.....	138

,

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Lactosa en la forma α y β	18
Figura 2. Diagrama del balance de masas para determinar el contenido de grasa de la mezcla.	27
Figura 3. Diagrama de flujo de la elaboración del dulce de leche con suero ácido y probióticos.	29
Figura 4. Características del color Matiz ($^{\circ}\text{H}$), Saturación (C_{ab}) y L (luminosidad).	50
Figura 5. Color de los cuatro tratamientos de dulce de leche.	52

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Hidrólisis de lactosa utilizando la enzima lactasa, para suero y leche.....	41
Gráfica 2. Porcentaje de hidrólisis de lactosa	43
Gráfica 3. Comportamiento de L en el almacenamiento a 25 °C, para los cuatro tratamientos de dulce de leche con suero ácido.	53
Gráfica 4. Comportamiento del los °Brix en el almacenamiento a 25 °C, para los cuatro tratamientos de dulce de leche con suero ácido.	55
Gráfica 5. Comportamiento del pH en almacenamiento, para los cuatro tratamientos de dulce de leche con suero ácido almacenados a 25 °C.....	56
Gráfica 6. Comportamiento de la actividad de agua a_w en el almacenamiento, para los cuatro tratamientos de dulce de leche con suero ácido almacenados a 25 °C.	58
Gráfica 7. Comportamiento de la prueba de dos ciclos o del perfil de textura (TPA) para los cuatro tratamientos de dulce de leche parcialmente sustituido con suero lácteo.	61
Gráfica 8. Comportamiento de la dureza de los cuatro tratamientos del dulce de leche parcialmente sustituido con suero almacenado a 25 °C.	62
Gráfica 9. Comportamiento de la adhesividad de los cuatro tratamientos del dulce de leche con suero almacenado a 25 °C.	64
Gráfica 10. Comportamiento del color (luminosidad L) en el tiempo de almacenamiento, en dulce de leche 75% suero, 25% leche con <i>Lactobacillus casei</i> . P = con probiótico, C = sin probiótico. ..	74
Gráfica 11. Comportamiento del color (Matiz (°H)) en el tiempo de almacenamiento, en dulce de leche 75% suero, 25% leche con <i>Lactobacillus casei</i> . P = con probiótico, C = sin probiótico ...	76

Gráfica 12. Comportamiento del color para la Saturación (C_{ab}) en el tiempo de almacenamiento, en dulce de leche 75% suero, 25% leche con <i>Lactobacillus casei</i> . P = con probiótico, C = sin probiótico.	78
Gráfica 13. Comportamiento °Brix en el tiempo de almacenamiento, en dulce de leche 75% suero, 25% leche con <i>Lactobacillus casei</i> . P = con probiótico, C = sin probiótico.....	79
Gráfica 14. Comportamiento del pH en el tiempo de almacenamiento, en dulce de leche 75% suero, 25% leche con <i>Lactobacillus casei</i> . P = con probiótico, C = sin probiótico.....	80
Gráfica 15. Comportamiento a_w en el tiempo de almacenamiento, en dulce de leche 75% suero, 25% leche con <i>Lactobacillus casei</i> . P = con probiótico, C = sin probiótico.	82
Gráfica 16. Comportamiento del perfil de textura (Dureza) en el tiempo de almacenamiento, en dulce de leche 75% suero, 25% leche con <i>Lactobacillus casei</i> . P = con probiótico, C = sin probiótico.	84
Gráfica 17. Comportamiento del perfil de textura (Adhesividad) en el tiempo de almacenamiento, en dulce de leche 75% suero, 25% leche con <i>Lactobacillus casei</i> . P = con probiótico, C = sin probiótico	85
Gráfica 18. Comportamiento del perfil de textura (Cohesividad) en el tiempo de almacenamiento, en dulce de leche 75% suero, 25% leche con <i>Lactobacillus casei</i> . P = con probiótico, C = sin probiótico.	86
Gráfica 19. Comportamiento de <i>Lactobacillus casei</i> en dulce de leche 75% suero, 25% leche en el tiempo de almacenamiento a diferentes temperaturas 15 °C y 4 °C.	89
Gráfica 20. Curva de crecimiento de <i>Lactobacillus casei</i> a 35°C en caldo MRS.....	109

INTRODUCCIÓN

La producción de leche es la principal empresa agrícola de Puerto Rico. Durante el año fiscal 2010-11, el valor del Ingreso Bruto Agrícola ascendió a 789.8 millones de dólares, de los cuales 235.1 correspondieron a la producción de leche, lo que constituye un 29.8% del total (ORIL, 2011). La Industria Lechera, además de ser fuente de producción de leche y carne, dos alimentos básicos en la dieta puertorriqueña, constituye la principal fuente de empleo agrícola. Se estima que en términos generales, la industria genera alrededor de 25,000 empleos (directos e indirectos) en la fabricación y venta de productos (ORIL, 2011). Los problemas han surgido porque la producción total excede por amplio margen a la demanda de leche fresca. La leche cruda que las plantas elaboradoras no pueden vender como leche fresca se define en la reglamentación como “leche excedente”, que aproximadamente es el 15% de la producción (Lara y Martínez, 2004). La Fase Industrial o mercadeo la componen tres (3) Plantas Elaboradoras de Leche Fresca que recogen la leche cruda, la elaboran y la mercadean pasteurizada y homogeneizada a través de toda la Isla entre estas esta Suiza Dairy, Corp., Vaquería Tres Monjitas, Inc (ORIL, 2011) y la Industria Lechera de Puerto Rico, Inc., la cual procesa el excedente de leche en leche UHT, quesos, mantequilla y otros productos lácteos (Lara y Martínez, 2004). Estas industrias han optado por elaborar productos derivados de leche fresca, como alternativa para buscar nuevos mercados y aumentar los ingresos evitando pérdidas. Por lo que la producción local de queso es relativamente importante; entre los cuales está el queso blanco del país (Varela-Villamor, 2006).

La fabricación de queso da inevitablemente lugar a la producción de una gran cantidad de suero que se ha convertido en un problema industrial y de salud pública, lo que resulta difícil

separar este problema de la producción (Scott, 1991). El suero ácido es un subproducto de la industria lechera que se obtiene mediante la precipitación y remoción de la caseína al añadir ácido acético a la leche durante la elaboración del queso blanco. Este subproducto representa aproximadamente de un 85 a un 90% del volumen de la leche y retiene 55% de los nutrientes de ella. Los nutrientes que están en mayor abundancia en el suero ácido son; lactosa, lípidos, proteínas solubles y minerales (Wit, 2001). El suero ácido representa un problema ambiental muy importante, debido a su alto contenido de materia orgánica y su alta demanda de oxígeno biológico. El suero de leche tiene una demanda biológica de oxígeno (DBO), entre 30-50,000 mg de oxígeno/ L, y una demanda química de oxígeno (DQO) de 60-100,000 mg de oxígeno /L (Gelegenis *et al.*, 2007).

Sin embargo, el suero y sus derivados como los concentrados de proteína de suero, tienen muchas aplicaciones de valor funcional como ingrediente en los alimentos. Puede modificar algunas o todas las propiedades de un alimento; tales como: organolépticas, visuales, de hidratación, surfactantes, estructurales, de textura y reológicas (Rosa, 2010). Por lo que es importante que la industria quesera tenga un portafolio de opciones para usar el suero como base de alimentos, preferentemente para el consumo humano, con el fin adicional de no contaminar el medio ambiente y de recuperar el valor monetario del suero, es así que el dulce de leche, se presenta como una alternativa para sustituir parcialmente la leche por suero y elaborar un dulce de leche a base de suero.

El dulce de leche es un derivado lácteo, similar a la leche condensada azúcarada, muy popular en algunos países sudamericanos como Argentina y Uruguay. Se produce mediante la concentración de la leche a 70% de sólidos totales por ebullición a presión atmosférica en

presencia de sacarosa (aproximadamente 20%), se añade bicarbonato de sodio para evitar la coagulación de la caseína y para favorecer la reacción de Maillard, responsable de su color marrón típico. Uno de los defectos más comunes del dulce de leche es la arenosidad, que está causada por la cristalización de la lactosa (Hough *et al.*, 1990; Martínez *et al.*, 1990). El problema más relevante de la producción de dulce de leche es la prevención de la cristalización de la lactosa. La cristalización, según Sabioni *et al.*, (1984^a), produce una textura arenosa y reduce la aceptabilidad del producto, la cual se puede evitar hidrolizando la lactosa con beta-D-galactosidasa, pero el costo de la enzima hace que el tratamiento sea poco rentable.

Cada día aumenta la búsqueda de beneficios en los alimentos que contribuyan a mejorar la salud, por tal motivo, los consumidores se preocupan por adquirir productos alimenticios que proporcionen ventajas nutricionales y beneficien la salud humana, estos alimentos se denominan como alimentos funcionales y actualmente están tomando auge en la dieta diaria de la población (Aldana, 2009), por lo que los profesionales de la salud están reconociendo los efectos beneficiosos de los probióticos sobre la salud y la nutrición humana (FAO/WHO, 2001).

Por lo tanto, esta investigación, busca ofrecer nuevas alternativas de alimentos funcionales y ser una alternativa para las industrias lácteas, para contrarrestar el impacto ambiental ocasionado por la mala disposición del suero lácteo con la elaboración de un dulce de leche parcialmente sustituido por suero y con probióticos (*Lactobacillus casei*).

1. OBJETIVOS

1.1. Objetivo principal

- Utilizar el lacto suero ácido en la elaboración de dulce de leche con probióticos.

1.2. Objetivos específicos.

- Elaborar dulce de leche con suero ácido en diferentes proporciones y evaluar el efecto sobre las características fisicoquímicas y sensoriales.
- Elegir el tratamiento con mejores características físicas y sensoriales y adicionar *Lactobacillus casei* como probiótico.
- Observar cómo influye la adición de probióticos sobre las características físicas y químicas del dulce de leche elaborado con suero ácido.
- Evaluar la supervivencia de las bacterias probióticas (*Lactobacillus casei*) en el dulce de leche durante el almacenamiento.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Dulce de leche

El Dulce de leche (DL) es un producto típico de América del Sur. Los principales países productores son Argentina y Uruguay, donde el dulce de leche se consume como postre o como ingrediente en productos alimenticios y otros productos de confitería (Hynes y Zalazar, 2009; Sabioni *et al.*, 1984a; Perrone, 2006; Garitta *et al.*, 2004).

El consumo en Argentina es de aproximadamente 2.70 kg per cápita por año, con una producción estable de 109,000 ton/año y Uruguay produce 9,000 ton/año, en otros países de América Latina, se consume el dulce de leche pero en menor cantidad (Hynes y Salazar, 2009). En Chile se conoce como manjar, manjar de leche o manjar blanco; en Colombia y Venezuela se le denomina arequipe; en Argentina, dulce de leche; en Brasil, doce de leite y en México y Centroamérica, cajeta (derivado de la caja de madera que se utilizaba para empacarlo) (Keating, 1999).

El dulce de leche, se define como un producto de textura blanda y pegajosa, elaborado a partir del proceso de evaporación de leche en presencia de sacarosa (aproximadamente 20%), hasta lograr una concentración en el contenido de sólidos solubles de 70 °Brix (Código Alimentario Argentino, 2010; Valencia *et al.*, 2008; NTC, 2008; Hough *et al.*, 1990; Rovedo *et*

al., 1991 y Garitta *et al.*, 2004). Este producto tiene un aporte calórico aproximado de 30 Kcal por porción (10 g) (Valencia *et al.*, 2008).

En la elaboración de dulce de leche se utiliza bicarbonato de sodio que sirve para neutralizar parte de la acidez de la leche evitando que la caseína precipite con el calor, y a la vez favorece la reacción de Maillard, esta reacción es responsable de los atributos característicos del producto: color marrón, textura cremosa y aroma agradable similar al caramelo (NTC, 2008; Hough *et al.*, 1990; Rovedo *et al.*, 1991; Perrone, 2006; Aldana, 2009). La naturaleza y extensión de la reacción de Maillard dependerá de numerosos factores, incluyendo la actividad del agua (a_w), el pH, la temperatura y el estado físico-químico de los componentes. La a_w del dulce de leche está por debajo de 0.85 (Morgan *et al.*, 2005, Rozycki, 2003).

El bicarbonato de sodio tiene un marcado efecto en la tasa de reacciones de Maillard en el dulce de leche. Por lo tanto, el uso de menores concentraciones de bicarbonato durante la fabricación del dulce de leche podría conducir a una menor velocidad de reacción de Maillard y por lo tanto menos cambios en el perfil sensorial, se recomienda utilizar es 1% (Giménez *et al.*, 2008^a; Moro y Hough, 1985).

En el caso particular del dulce de leche, los compuestos que participan en la reacción de Maillard son principalmente la lactosa y las proteínas propias de la leche, mientras que en las reacciones de caramelización lo hace principalmente la sacarosa. La sacarosa, por ser un disacárido no reductor, no participa inicialmente de la reacción de Maillard salvo el porcentaje que posteriormente se hidroliza durante el tratamiento térmico, lo cual depende principalmente del pH y la temperatura (Rozycki, 2003).

El defecto más común del dulce de leche es la arenosidad, ocasionada por la cristalización de lactosa (Hough *et al.*, 1990; Sabioni *et al.*, 1984a). Esto provoca rechazo del producto siendo inevitable la cristalización, a menos que el contenido de lactosa se reduzca (Giménez *et al.*, 2008; Giménez *et al.*, 2007; Hough *et al.*, 1990; Sabioni *et al.*, 1984a; Martínez *et al.*, 1990; Sabioni *et al.*, 1984; Gänzle *et al.*, 2008).

Sin embargo, en un estudio realizado por Giménez *et al.*, (2007) menciona que la percepción de arenosidad causada por la cristalización de la lactosa no está directamente relacionada con la cantidad de lactosa cristalizada, sino más bien a la distribución del tamaño de los cristales y los aglomerados. El crecimiento y aglomeración del cristal depende de la composición, temperatura de almacenamiento y manipulación de la muestra. En general se entiende que la cristalización rápida produce cristales pequeños (Fox y McSweeney, 2009).

Generalmente, todo lo que se necesita para hidrolizar la lactosa es una enzima o un proceso químico que rompa el enlace que conecta los dos monosacáridos. Una alternativa para la hidrólisis de lactosa se conoce desde principios del siglo XX, la cual que requiere condiciones extremadamente ácidas ($\text{pH} < 1.5$) y temperaturas muy altas ($150\text{ }^{\circ}\text{C}$). Este enfoque ha suscitado un renovado interés en Australia, los Países Bajos y Nueva Zelanda, pero resultó ser de aplicación industrial limitada (Gänzle *et al.*, 2008).

Otra alternativa tecnológica, que ha sido desarrollada, se trata de reducir el contenido de lactosa con la hidrólisis de la leche con la enzima β -D-galactosidasa antes de la fabricación de dulce de leche (Giménez *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 1990; Sabioni *et al.*, 1984a).

Sin embargo, la hidrólisis de lactosa podría causar notables cambios en el perfil sensorial del dulce de leche, sobre todo en su color, textura y sabor, esto debido al aumento en la velocidad de las reacciones de Maillard como consecuencia del aumento del contenido del azúcar reductor como lo es galactosa y glucosa (Giménez *et al.*, 2007; Giménez *et al.*, 2008; Hough *et al.*, 1990). Si bien se han realizado diversos trabajos relativos al dulce de leche, muy pocos de ellos han evaluado los aspectos cinéticos del desarrollo de color y determinación de parámetros colorimétricos a pesar de que el color es un atributo principal para aceptar o rechazar el producto (Rozycki, 2003).

La galactosa y glucosa producidas por hidrólisis de lactosa son solubles en agua a concentraciones de 32 y 50% w/v, a 25°C. Juntos tienen mayor poder reductor que la lactosa, y aceleran el pardeamiento no enzimático durante la fabricación de dulce de leche (Sabioni *et al.*, 1984a; Gänzle *et al.*, 2008).

Silva *et al.* (1980), utilizó la enzima lactasa en la fabricación de dulce de leche y observó que con una hidrólisis del 20% garantiza la estabilidad física del producto por más de 120 días a temperatura ambiente, sin embargo, el producto obtuvo un color más oscuro que el control. Aldana (2009), recomienda, una hidrólisis del 40% de lactosa con β -galactosidasa en la proporción de 7 mL/40 L a una temperatura constante de 40°C para controlar el problema de formación de cristales en el producto final, y reduce los efectos adversos en el perfil sensorial.

Coelho *et al.* (1980), en un experimento similar, utiliza la enzima lactasa, a concentraciones entre de 20 a 2000 mg/ L de leche, y observó mejores resultados utilizando de

40 mg/L seguido por una incubación a 38 – 40 °C durante 4 horas. A estas concentraciones no se observaron cambios de color ni alteración de las características normales del dulce.

La hidrólisis de lactosa con beta-D-galactosidasa evita la cristalización, sin embargo, el costo de la enzima limita su utilización (Sabioni *et al.*, 1984b; Martinez *et al.*, 1990). En estudios realizados por Sabioni *et al.* (1984a), para reducir los costos de la enzima, utiliza células de levadura *Kluyveromyces lactis* para fermentar la lactasa. Esto logró impedir la cristalización de lactosa del dulce de leche por 120 días almacenado a temperatura ambiente. Aunque el producto tenía un ligero sabor a fermentado esto no fue considerado significativo en un análisis sensorial.

Estudio realizado por Sabioni *et al.* (1984b), buscó controlar la cristalización utilizando células permeabilizadas de *Kluyveromyces lactis* a una concentración de 400 y 800 mg/L en leche, seguido de incubación por 2.5 ó 3.5h a 35 °C, esto dio lugar a una hidrólisis de 45.02 y 69.13% de la lactosa a una temperatura óptima de actividad de la lactasa de 45°C. Esto no ocasionó cristalización de lactosa después de 120 días de almacenamiento y las cualidades sensoriales de los dulces fueron similares a los del control (Sabioni *et al.*, 1984).

El comportamiento reológico de dulce de leche es intermedio entre una solución concentrada y un gel, dependiendo del tipo y el contenido de sólidos (Pauletti *et al.*, 1990) y Rovedo *et al.* (1991) estudió el comportamiento reológico de muestras comerciales de dulce de leche de uso doméstico y repostería, demostró que los productos tienen características tixotrópicas y pseudoplásticas. El análisis de viscosidad aparente, se encontró que disminuye cuando se aumenta la temperatura (25, 40 y 55°C), la viscosidad aparente, a pH ácido (pH = 3.0), es menor que a pH alcalino (pH = 8.3) y que este es mayor que la muestra original (pH = 6,1). El

efecto del pH se hace más pronunciado con el tiempo de almacenamiento; el pH es un factor importante en la cristalización de lactosa, en condiciones alcalinas afecta la tasa de mutrorrotación y acelera la cristalización (Gänzle *et al.*, 2008).

La Comisión Nacional de Normas y Estándares para Alimentos del Brasil, el Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación y el Código Alimentario Argentino, tienen establecido estándares físicos, químicos y microbiológicos para el dulce de leche tradicional (Tabla 1 y 2).

Tabla. 1. Requisitos Fisicoquímicos que rigen el Dulce de Leche según el País.

Registro	Colombia [*]	Argentina ^{**}	Brasil ^{***}
Humedad de masa, máx. %	30	-	30
Materia grasa láctea, fracción de masa, mín%.	7.0	6.0 – 9.0	2.0
Sólidos lácteos no grasos, fracción de masa, mín%.	17.0	-	-
Proteína, mín%.	-	5.0	6.0
Extracto seco, fracción de masa, mín%.	70	70	70
Cenizas, fracción de masa, máx%.	2.0	2.0	2.0
Índice de Reichert Meissl, fracción de masa%.	23 – 32	-	-
Almidones	Negativo	Negativo	Max 2.0

^{*} Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. 2008.

^{**} Código Alimentario Argentino. 2010.

^{***} Agência Nacional de Vigilância Sanitária Brasil.

Tabla. 2. Requisitos Microbiológicos para el Dulce de Leche.

Requisito	n*	m*	M*	c*
Recuento de coliformes, UFC/g	5	10	100	2
Recuento de Escherichia coli, UFC/g	5	<*10	--	0
Recuento de mohos y levaduras, UFC/g	5	10	100	2
Recuento de Staphylococcus aureus coagulasa positiva, UFC/g	5	100	200	2

*n= número de muestras del lote que se van a examinar, *m = índice máximo permisible para identificar nivel de buena calidad, *M = índice máximo permisible para identificar nivel aceptable de calidad, *c = número de muestras permitidas con resultado entre m y M. (NTC, 2008)

En la elaboración de dulce de leche, las materias primas se someten a temperaturas sobre los 100 °C por más de una hora, lo que hace innecesario una pasteurización previa (Novoa, 1993).

En el empaque del dulce de leche, no es conveniente enfriar a menos de 60 °C ya que esto aumentaría demasiado la viscosidad, lo cual dificulta las operaciones de empaque y aumenta los riesgos de contaminación durante ésta operación (Novoa, 1993).

Entre los estudios sensoriales del dulce de leche se encuentra, la determinación del tiempo óptimo de almacenamiento en relación a los cambios sensoriales del producto y a la temperatura de almacenamiento. Las características sensoriales analizadas fueron el sabor (plástico, cocido, metálico, óxido) y cambios de color y observó que el empaque puede generar un sabor a plástico en el producto y el contenido de grasa puede generar sabor a óxido, por lo tanto, son puntos sensoriales críticos durante el almacenamiento. Con respecto a las temperaturas de almacenamiento se encontró que 25 °C permite un tiempo de almacenamiento del producto de 109 días sin que se vean afectadas las características sensoriales evaluadas. A medida que aumenta la temperatura de almacenamiento el tiempo de vida útil del producto se reduce (37 °C, 53 días; 45 °C, 9 días) (Garitta *et al.*, 2004).

En un trabajo realizado por Dias et al., (2008) se evaluó sensorialmente el dulce de leche producido con la sustitución parcial de suero dulce (0%, 10%, 20%, 30% y 40%). Los paneles fueron analizados estadísticamente, y se obtuvo que la muestra con 20% de suero fue la de mayor aceptabilidad. Además se observa que el dulce de leche tradicional y el parcialmente sustituido con 20% suero se encuentran dentro de los estándares requeridos. Por lo que si es viable el reemplazo de la leche por suero.

2.2. Suero lácteo

El suero, es un subproducto líquido remanente que queda de la producción de queso por precipitación de la caseína. Es de color amarillo verdoso, contiene aproximadamente 6.0 a 6.4% de sólidos y alrededor de 55% de los nutrientes que permanecen en la leche original, es decir, proteínas solubles, lactosa, vitaminas y minerales (Almeida *et al.*, 2001; Siso, 1996; Polat, 2009; Spalatel, 2012). El más abundante de estos nutrientes es la lactosa (4.5 a 5.0% w/v), las proteínas solubles (0.6-0.8% w/v), lípidos (0.4 a 0.5% w/v) y sales minerales (0.53 a 0.79 w/v) (Spalatel, 2012; Wit, 2001). El color amarillento de suero de leche es producto de la presencia de riboflavina (vitamina B2) (Wit, 2001).

El sector lácteo genera desperdicios líquidos significativos, cuya eliminación requiere un gran capital de inversión. La mayoría de las elaboradoras de leche no cuentan con sistemas adecuados de tratamiento para la eliminación de suero de leche (Polat, 2009).

La elaboración de queso, tanto por sistemas tradicionales como modernos, dan inevitablemente lugar a la producción de una gran cantidad de suero que representa aproximadamente de un 85 a un 90% del volumen total de la leche empleada (Scott, 199; Wit, 2001).

La producción mundial de suero de leche es de aproximadamente 120 millones de toneladas anuales, lo que genera 720,000 toneladas de proteína (Giraldo-Zúñiga *et al.*, 2002). Brasil es el séptimo mayor productor de queso en el mundo con una producción total de 480,000 toneladas en 2005, generando aproximadamente 4.3 millones de toneladas de suero de leche (USDA, 2008). Este dato implica una gran pérdida de recursos y un serio problema de contaminación debido a que el suero es altamente orgánico con una alta demanda de oxígeno biológico. El suero de leche tiene una demanda biológica de oxígeno (DBO), entre 30-50,000 mg de oxígeno/L, y una demanda química de oxígeno (DQO) de 60-100,000 mg de oxígeno/L (Gelegenis *et al.*, 2007; Siso, 1996), (Dias *et al.*, 2008). Sin embargo, aproximadamente la mitad de la producción mundial de suero no se trata y se descarta como efluente, por lo tanto, el suero representa un importante problema ambiental, debido a los grandes volúmenes producidos y su alto contenido en materia orgánica, mayormente lactosa, responsable de la alta producción de DBO y DQO (Guimaraes *et al.*, 1992; Spalatel, 2012; Siso, 1996).

2.2.1. Composición del suero.

La composición química del suero puede variar, según el tipo de queso, composición química de la leche, la cual varía con la etapa de lactancia, tipo de alimentación, número de cría,

las diferencias individuales de los animales, y el clima (Wit, 2001; Polat, 2009). Los componentes del suero decrecen en el siguiente orden: lactosa, compuestos nitrogenados (proteínas, péptidos y aminoácidos), ceniza y lípidos. Los componentes minerales mayores del suero son calcio, fósforo, sodio y potasio (Schmidt *et al.*, 1984; Polat, 2009).

De acuerdo con el procedimiento utilizado para la elaboración de queso, el suero producido puede ser ácido (pH <5.0) o dulce (pH 6.0-7.0). Como consecuencia el suero ácido es más difícil de procesar y tiene mayores costos de eliminación que el suero dulce (Siso, 1996). Su uso en los alimentos es más limitada que la de suero dulce, debido a su sabor ácido (Spălățelu, 2012).

Tabla. 3. Composición del suero lácteo.

Constituyente	Suero dulce %	Suero ácido %
Agua	93 – 94	94 – 95
Lactosa	4.5 – 5.0	3.8 – 4.2
Proteína	0.6 – 0.8	0.6 – 0.8
Grasa	0.2 – 0.8	0.2 – 0.5
Cenizas	0.5 – 0.8	0.7 – 0.9
pH	6.2 – 6.6	4.5 – 4.7

Wit, 2001.

Al igual que el suero ácido, el suero dulce posee un alto contenido de ceniza y es un subproducto de la industria de queso, pero es menos ácido (pH 5.9 – 6.6) y es producido por la coagulación de la leche con renina. Sin embargo, a diferencia del suero ácido puede ser utilizado por sus numerosas propiedades funcionales como dar color, brindar tamaño y producir espuma.

También posee una mezcla compleja de lactosa, proteínas, minerales. Por estas razones la industria de alimento ha reconocido que el suero dulce es un buen ingrediente para ser incorporado a un alimento, al igual que el suero ácido, el suero dulce también es utilizado como un componente importante en los alimentos de animales (Banavara *et al.*, 2003).

Algunas proteínas recuperadas a partir de suero ácido pueden ser de particular interés como es la glicoproteína de la familia de la Transferrina, Lactoferrina (LF), un estudio preliminar sugiere que el suero ácido contiene mayor concentración de LF en comparación con el suero dulce (Blaschek *et al.*, 2007).

2.2.2. Usos del suero lácteo

Siso (1996) y Spalatelu (2012) mencionan que aproximadamente 50% de la producción mundial total de suero es tratada y transformada en diversos productos alimenticios. Este porcentaje va en aumento, debido a los esfuerzos continuos de investigaciones que buscan darle utilidad al suero, y la promoción de legislaciones actuales referentes a la eliminación de efluentes. La recuperación, fraccionamiento y transformación de suero de leche puede contribuir a un aumento económico para los productores, conciliando el interés del sector productivo con las demandas sociales de protección del ambiente, en el marco del desarrollo sostenible (Spalatelu, 2012).

De la producción mundial de suero, la mitad de esta cantidad se utiliza directamente en forma líquida, 30% como suero en polvo, 15% como lactosa y sus derivados, y el resto como concentrado de proteína (Spalatelu, 2012), por lo que según Guimaraes *et al.* (1992), el suero

debe considerarse como un recurso, y no sólo como un efluente residual, en vista de su gran potencial como una fuente para desarrollar productos de valor agregado.

El primer paso en la mayoría de los procedimientos para la valorización del suero lácteo consiste en la recuperación de la proteína. Las proteínas del suero representan alrededor del 20% de las proteínas de la leche, tienen un alto valor nutricional y potencial terapéutico (Guimaraes *et al.*, 1992). La separación de las proteínas de suero de leche se consigue típicamente mediante ultrafiltración para producir concentrados de proteína de suero, que tienen muchas aplicaciones en la industria alimentaria (Siso, 1996).

El suero en polvo se utiliza principalmente para la alimentación animal y en cantidades más pequeñas en alimentos de consumo humano, tales como helados, productos de panadería, pastelería, salsas, derivados lácteos, etc. (Siso, 1996).

La lucha constante para encontrar nuevos usos para el suero de queso está ligada a la búsqueda de nuevos usos para la lactosa, el principal componente de suero de leche. Cada vez es más difícil disponer de suero de leche o cualquier corriente de proceso que contengan altas cantidades de lactosa de la leche porque:

- Las normas ambientales de descarga son cada vez difícil de cumplir.
- Los tratamientos físico-químicos y biológicos son cada vez más complejos y costosos.
- Las zonas de tratamiento de residuos son cada vez más costosas.

Por lo tanto, el deseo de convertir la lactosa en productos comercialmente viables va en aumento (Gänzle *et al.*, 2008).

Se puede extraer lactosa del suero de leche. La lactosa se usa como suplemento en fórmulas para bebés ya que la leche de vaca contiene 30% menos lactosa que la leche humana. También se utiliza en confitería debido a su bajo dulzor en comparación con la sacarosa o la glucosa. Estas dos aplicaciones representan más del 80% del consumo de lactosa en los Estados Unidos y un 35% en la Unión Europea donde se utiliza en otras aplicaciones como en productos de panadería y productos cárnicos (Fox y Mcsweeney, 2009).

2.3. Lactosa

La lactosa está presente en la leche de todos los mamíferos con unas pocas excepciones, la concentración aproximada en la leche de mamíferos es de entre 2% y 10%, además, contenido de lactosa en leche bovina oscila entre el 4.4% y el 5.2%, en comparación con leche humana que tiene el 7% (Gänzle *et al.*, 2008).

La lactosa (4-0-b-galactopiranosil-D-glucopiranososa, $C_{12}H_{22}O_{11}$), es un azúcar reductor, es decir, tiene grupo carbonilo libre o potencialmente libre (un grupo aldehído en el caso de la lactosa). Es un disacárido que comprende una molécula de glucosa y a una molécula de galactosa unidas por enlace glicosídico β 1-4. (Fox y Mcsweeney, 2009; Gänzle *et al.*, 2008). Lactosa en soluciones acuosas está presente en las formas α y β (Figura 1).

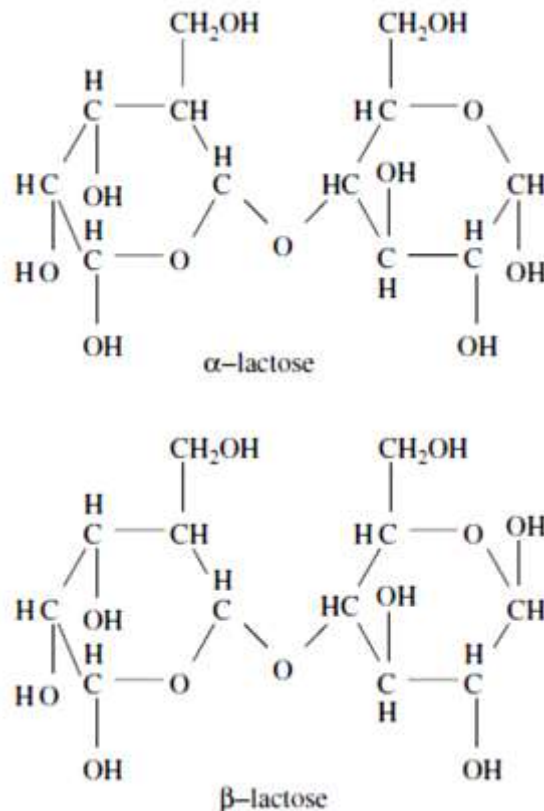


Figura 1. Lactosa en la forma α y β

Como todos los azúcares reductores, la lactosa puede participar en la reacción de Maillard (pardeamiento no enzimático), que produce polímeros que contribuyen positivamente al sabor y color de muchos alimentos, pero los efectos en los productos lácteos suelen ser negativos y deben ser evitados (Fox y Mcsweeney, 2009; Jelen y Tossavainen, 2003).

La concentración de lactosa en la leche es inversamente proporcional a la concentración de lípidos y a la concentración de caseína. La función principal de la lactosa y los lípidos de la leche es ser fuente de energía. La relación inversa entre las concentraciones de lactosa y caseína refleja el hecho de que la síntesis de lactosa elimina agua en las vesículas de Golgi, diluyendo así la concentración de caseína. Cuando se requiere una leche altamente calórica, los animales

proviene de un ambiente frío, esto consigue aumentar el contenido de grasa de la leche (Fox y McSweeney, 2009).

La solubilidad de la lactosa en agua es baja en comparación con otros disacáridos (alrededor de 18g/100g de agua a temperatura ambiente). En los alimentos congelados o de baja humedad, su cristalización provoca aspereza o si su tamaño en los productos alimenticios es más de 10-16mm se pueden detectar sensorialmente y crear un defecto llamado arenosidad (Gänzle *et al.*, 2008; Jelen y Tossavainen, 2003).

La cristalización en su concepto más básico es un proceso de dos etapas que implica la nucleación y el crecimiento del núcleo a un tamaño macro. En general, la tasa de crecimiento de los cristales aumenta rápidamente a medida que la sobresaturación (presión de precipitación, expresada como proporción de la concentración real a la solubilidad) se incrementa (Gänzle *et al.*, 2008). En general se entiende que la cristalización rápida produce cristales pequeños (Fox y McSweeney, 2009).

La α y β -lactosa tienen solubilidades muy diferentes. β -lactosa es mucho más soluble en condiciones ambientales y la α -lactosa superior 93,5 °C. El equilibrio mutarotatorio favorece la baja solubilidad de la lactosa en temperatura ambiente y alta solubilidad a temperaturas cercanas a 93 °C (Gänzle *et al.*, 2008).

Considerando la fase acuosa del dulce de leche, la concentración de lactosa y sacarosa, es de 33g de lactosa/100 g H₂O y 146g de sacarosa/ 100 g H₂O, respectivamente, a estas concentraciones la lactosa es completamente soluble a 60 °C (Martínez *et al.*, 1990).

Tabla. 4. Densidad, viscosidad e índice de refracción de la lactosa en función de la concentración.

Concentración (g lactosa/ 100g agua)	Densidad de la solución a 20°C (Kg*m ⁻³)	Densidad aparente de la lactosa disuelta en agua (Kg*m ⁻³)	Viscosidad de la solución (mPa*s)		Índice de refracción de la solución a 25 °C $\lambda =$ 589nm
			20°C	60°C	
0	998.2	-	1.00	0.47	1.3325
10	1043	1750	1.38	0.70	1.3484
20	1082	1629	2.04	0.90	1.3659
30	1124	1592	3.42	1.29	-
40	1173	1591	7.01	2.19	-

Walstra *et al.*, 2005.

El Instituto Nacional de Diabetes y Enfermedades Digestivas y Renales (NIDDK) estima que de 30 a 50 millones de estadounidenses son intolerantes a la lactosa. Ser intolerantes a la lactosa, significa que no se puede digerir el azúcar natural que se encuentra en la leche (lactosa) y otros productos lácteos. Las personas que no pueden digerir la lactosa tienen una escasez, o deficiencia de la enzima lactasa, que se produce en el intestino delgado (FDA, 2009). La hidrólisis descompone la lactosa en azúcares simples (glucosa y galactosa) e incrementa el consumo de los productos lácteos en todo el mundo mediante la mitigación de intolerancia a la lactosa (Gänzle *et al.*, 2008).

En la industria farmacéutica la lactosa se usa como excipiente para la mayoría de los fármacos en tabletas ya que es inerte, no higroscópica, están disponible con alta pureza, y tiene buenas propiedades como aglutinante (Fox y Mcsweeney, 2009).

2.4. Probióticos

Los probióticos son microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio saludable al huésped (FAO/WHO, 2001; Zayed y Roos, 2004; Pereira et al., 2011).

Los profesionales de la salud están reconociendo cada vez más los efectos beneficiosos de los probióticos sobre la salud y la nutrición humana. Estudios científicos recientes sobre las propiedades y la funcionalidad de microorganismos vivos en los alimentos sugieren que los probióticos desempeñan un importante papel en las funciones inmunes, digestiva y respiratoria en el organismo, y que podrían tener un efecto significativo en el alivio de las enfermedades infecciosas en los niños y otros grupos de alto riesgo (FAO/WHO, 2001).

Los microorganismos probióticos aparecen en el tracto gastrointestinal del hombre desde etapas tempranas de la vida, pero al pasar el tiempo y debido a factores como la edad, dieta, ambiente, el estrés y la medicación, descienden a cantidades que pueden llegar a ser muy pequeñas lo cual puede favorecer el crecimiento de bacterias patógenas (Corrales *et al.*, 2007).

Un alimento probiótico se define como un alimento que contiene microorganismos probióticos viables en las poblaciones suficientes incorporadas en una matriz adecuada (Doyle y Klaenhammer, 2000; Gibson y Roberfroid, 1995; Saxelin *et al.*, 2003). Sin embargo, las poblaciones de cultivos probióticos 10^6 a 10^7 UFC/g en el producto final se establecen como cantidades terapéuticas en los alimentos procesados (Talwalkar *et al.*, 2004; Jaworska *et al.*, 2011).

Los microorganismos probióticos utilizados en los alimentos deberían ser capaces no sólo de sobrevivir al paso por el aparato digestivo, sino también de proliferar en el intestino. Esto significa que debe ser resistente a los jugos gástricos y poder propagarse en presencia de bilis, en las condiciones existentes en los intestinos, o ser consumidos en un alimento que, actuando como vehículo, les permita sobrevivir al paso por el estómago y a la exposición a la bilis (Sanz, 2007; FAO/WHO, 2001).

Como microorganismos probióticos se utilizan sobre todo, aunque no exclusivamente, bacterias ácido lácticas, de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, y el número de alimentos probióticos puestos a disposición de los consumidores es cada vez mayor (FAO/WHO, 2001).

El género *Lactobacillus* es parte de la familia *Lactobacillaceae* que pertenece al grupo de las bacterias ácido lácticas, caracterizadas por ser Gram positivas, no esporulantes, y principalmente por producir ácido láctico como metabolito primario a partir de hidratos de carbono. *Lactobacillus*, que actualmente incluye 177 especies, es el género más grande y diverso de las bacterias ácido lácticas (Broadbent *et al.*, 2012).

Lactobacillus casei fue llamado inicialmente como *Streptobacterium casei* por Orla-Jensen en 1916. Su primer aislamiento fue en queso, desde entonces, *Lactobacillus casei* ha demostrado que es un grupo de bacterias ampliamente distribuido. Se puede encontrar en diversos hábitats, incluyendo material vegetal en descomposición, ensilaje, tracto intestinal humano, la boca, la vagina, los alcantarillados y diversos productos lácteos. Debido a su naturaleza acidúricos, se encuentran en diferentes productos fermentados tanto de origen vegetal y animal. Las dos especies más comunes en leche son *Lactobacillus paracasei subsp* y *Lactobacillus rhamnosus* (Curry y Crow, 2002; Broadbent *et al.*, 2012).

A lo largo de la historia se observa el uso de bacterias lácticas en la fermentación de una variedad de alimentos y bebidas, y existe un creciente número de evidencia científica sobre sus efectos benéficos para la salud. En la actualidad, las bacterias lácticas son ampliamente utilizadas como probióticos en los alimentos y productos farmacéuticos. *Lactobacillus casei* y organismos relacionados (el grupo de *L. casei*) son bacterias lácticas típicamente utilizadas en los productos lácteos y bebidas lácticas (Sato *et al.*, 2012; Erdogrul y Erbilir, 2006).

La industria láctea, en particular, ha encontrado en los cultivos probióticos una herramienta para el desarrollo de nuevos productos funcionales (Doyle y Klaenhammer, 2000; Champagne *et al.*, 2005; Erdogrul y Erbilir, 2006). El yogurt y las leches fermentadas son los principales vehículos de cultivos probióticos. Sin embargo, nuevos productos se están introduciendo en el mercado internacional (postres a base de leche, leche en polvo para recién nacidos, helados, mantequilla, mayonesa, diversos tipos de quesos, productos en forma de cápsulas o polvos que se disuelven en bebidas frías y alimentos fermentados de origen vegetal) (Champagne *et al.*, 2005).

Cuando se consumen alimentos que contiene probióticos en una cantidad tal que se logre su conservación en número o alcancen niveles importantes en el intestino, el huésped puede experimentar una serie de beneficios como el mejoramiento de la tolerancia a la lactosa, actividad antimicrobiana, estimulación del sistema inmunológico, reducción del colesterol sanguíneo, propiedades antimutagénicas, actividades anti-cancerígenas y propiedades anti-diarreicas (Doyle y Klaenhammer, 2000; Corrales *et al.*, 2007; Escobar, 2010; Pereira *et al.*,

2011; Jaworska *et al.*, 2011). Cabe destacar que los beneficios citados anteriormente no son generales de todos los probióticos sino de cepas específicas (Corrales *et al.*, 2007).

Con respecto a la producción y el almacenamiento, los requisitos más importantes son que las bacterias probióticas sobrevivan en el producto en la cantidad suficiente, que se garantice su estabilidad física y genética durante el almacenamiento y que se mantengan todas sus propiedades benéficas esenciales después del consumo. Los probióticos no deben tener efectos adversos en el sabor o aroma del producto (Aldana, 2009; Zayed y Roos, 2004). Aunque para algunos productos los elementos derivados de las bacterias lácticas, producen a menudo otros sabores o aromas característicos. El acetaldehído, por ejemplo, da al yogurt su aroma característico, mientras que el diacetilo confiere el sabor a mantequilla en la leche fermentada (García y Jerez, 2004).

2.5. Goma agar

El bajo contenido de sólidos en el suero lácteo hace necesario utilizar goma, para alcanzar las características deseadas de textura en el dulce de leche. Para este trabajo utilizamos agar.

El agar es un hidrocoloide obtenido de algas marinas. Su estructura principal se caracteriza químicamente por unidades repetitivas de D-galactosa y 3-6, anhidro-L-galactosa, con algunas variaciones, y un bajo contenido de ésteres de sulfato. El agar también se puede añadir en una mezcla de polisacáridos hechos de dextro y levo galactosas unidos linealmente (Armisen y Galatas, 2009). Los más importantes son alginatos, agar y carragenatos que se

producen en cantidades industriales y se presentan en forma de polvos de colores claros (Banerjee & Bhattacharya, 2011).

2.5.1. Gelificación de agar.

El agar es una mezcla de agarosa y agaropectina en proporciones variables dependiendo de la materia prima original y el proceso de fabricación empleado. La gelificación se produce por el contenido de agarosa que se produce exclusivamente por enlaces de hidrógeno. Sin necesidad de otra sustancia, el gel tiene un enorme potencial en aplicaciones tales como ingrediente alimenticio, la biotecnología, para cultivo celular y de tejidos o como apoyo para la electroforesis o cromatografía. La propiedad más destacable es su reversibilidad; se funden simplemente por calentamiento y vuelve a gelificarse al enfriar (Armisen y Galatas, 2009).

El gel es rígido, posee formas bien definidas y puntos de fusión y de gelificación precisos. Además, demuestra claramente los interesantes fenómenos de sinéresis (extrusión espontánea de agua a través de la superficie del gel en reposo) e histéresis (intervalo de temperatura entre las temperaturas de fusión y gelificación). La gelificación ocurre a temperaturas muy inferiores a la temperatura de fusión. Una solución de 1.5% de agar-agar forma un gel al ser enfriado a temperatura de 32 °C a 45 °C y la fusión de tal gel no ocurre a temperaturas inferiores a 85°C. La fuerza de gel del agar-agar es influenciada por los factores concentración, tiempo, pH y contenido de azúcar. El pH afecta notablemente la fuerza de gel del agar-agar y la disminución del pH disminuye la fuerza de gel (Armisen y Galatas, 2009).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materia prima: suero lácteo ácido

El suero ácido se elaboró en el Laboratorio de Lácteos del Departamento de Industria Pecuaria. La leche cruda se obtuvo de la vaquería de la Subestación Experimental en Lajas, Universidad de Puerto Rico – Mayagüez. La leche se pasteurizó a 63°C por 30 minutos previo a la elaboración del queso. El queso blanco se elaboró calentado la leche a 85°C y añadiendo ácido acético para precipitar la caseína, el suero obtenido se recolectó bajo condiciones higiénicas y se almacenó a una temperatura de -5°C.

3.1.1. Estandarización del suero ácido y la mezcla suero/leche

Previo a su uso se determinó la acidez titulable utilizando el método 942.15 de la Asociación Oficial de Químicos Analíticos (AOAC por sus siglas en inglés). El suero se neutralizó con una solución de hidróxido de sodio (NaOH) 6N, llevando el pH de 5.43 a 6.3, según AOAC 981.12 (AOAC, 1998). Se determinó el contenido de grasa en leche, suero y mantequilla utilizando el método de Mojonnier AOAC 989.05 (AOAC, 1998). Este valor se utilizó en la ecuación de balance de masas, a fin de determinar la cantidad de mantequilla necesaria para estandarizar las formulaciones a un porcentaje deseado de grasa 3.6%, para esto se realizó un balance de masa (Figura 2).

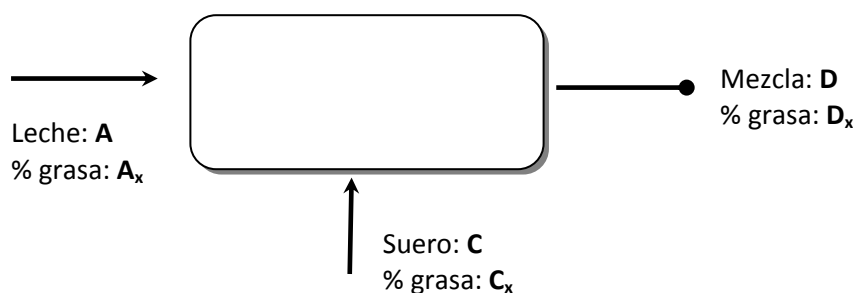


Figura 2. Diagrama del balance de masas para determinar el contenido de grasa de la mezcla.
Ecuación por componentes.

$$A + C = D \quad (1)$$

Ecuación por fracciones.

$$A_x + C_x = D_x \quad (2)$$

Con el balance de masa y las ecuaciones 1 y 2 se encuentra el valor de D_x que es la cantidad de grasa de la mezcla suero /leche, luego se utilizó el cuadro de Pearson para determinar la cantidad de mantequilla a adicionar y luego se homogeniza la mezcla a $75\text{ }^{\circ}\text{C} - 80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2. Hidrólisis de lactosa.

Al suero y leche homogenizados se le adicionó 0.3g/L de la enzima lactasa (lactase MP, Enzyme Development Corporation), luego se incubó a $38 - 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 3h, con agitación constante, para garantizar una hidrólisis del 40%, rápidamente que pasó este periodo se aumentó la temperatura a 80°C para detener la hidrólisis de lactosa.

Los experimentos para determinar la cantidad de lactasa que hidrolizan la lactosa se realizó según lo reportado por Coelho, (1980), el cual utilizó 40 mg/L. Se trabajó con diferentes proporciones de lactasa a una temperatura entre $38 - 40^{\circ}\text{C}$. Se realizó ensayos previos empleando un litro de leche estandarizada a 3,6% m/v. Se adicionó la enzima utilizando diferentes

proporciones, y se incubó tomando el punto crioscópico (Advanced Instruments, Model 4250 Single-Sample Cryoscope) cada 30 min hasta obtener el punto crioscópico constante, donde se considera el 100% de hidrólisis.

3.3. Elaboración del dulce de leche (Figura 3)

3.3.1. Dosificación de suero ácido y leche

La fabricación del dulce de leche se llevó a cabo siguiendo el procedimiento utilizado por Madrona. *et., al* (2009) con ciertas modificaciones. Se prepararon las siguientes formulaciones: 0% Leche/100% Suero, 25% leche/75% Suero, 50% Leche/50% Suero y 100% Leche/0%Suero. Los demás ingredientes como el neutralizante (bicarbonato de sodio) se emplearon en las mismas proporciones 1g/L y el azúcar a un 18 % p/v. La adición del azúcar se realizó en dos tiempos: primero un 50% al inicio y el restante cuando alcanzó 40 °Brix (medido con el refractómetro Fisher Scientific Handheld Refractometers).

Teniendo en cuenta las características del dulce de leche tradicional, el estudio sensorial (mayor preferencia del consumidor) y las características fisicoquímicas. Se escoge un tratamiento a la cual se le adicionó cultivos probióticos a la cual se le determina sobrevivencia y se realiza recuento microbiano.

FLUJOGRAMA DE LA ELABORACIÓN DEL DULCE DE LECHE

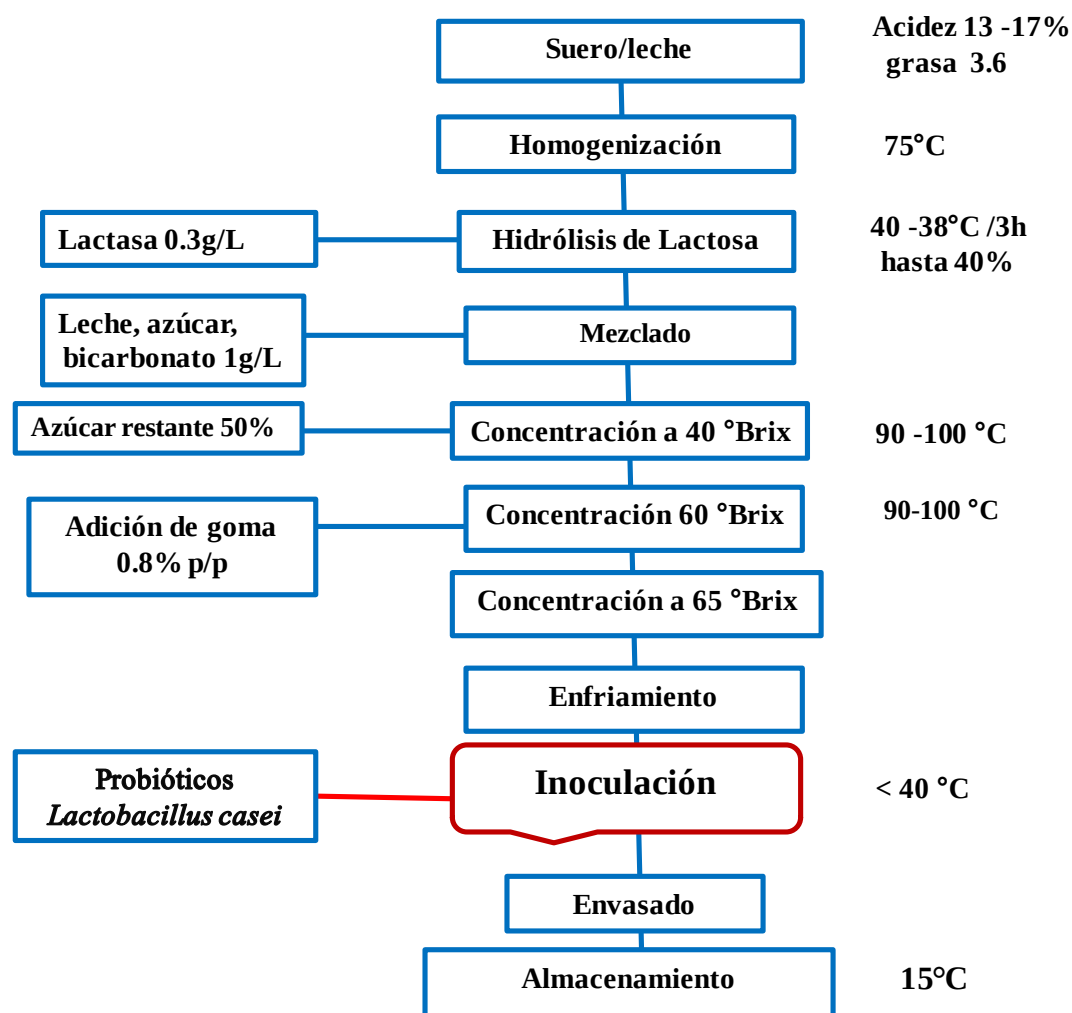


Figura 3. Diagrama de flujo de la elaboración del dulce de leche con suero ácido y probióticos.

3.3.2. Adición de goma.

Cuando el producto alcanzó 60 ± 0.3 °Brix se adicionó la goma (Agar Agar 100-44 HG) en una proporción de 0.8 %p/p con relación al rendimiento del producto final aproximadamente 30% (valor obtenido de ensayos preliminares). Se dejó hervir hasta alcanzar 65 ± 3 °Brix, cada

formulación se coció en ollas de acero inoxidable a 90 – 100 °C con agitación constante por 2.5 a 3 horas. Después se dejó enfriar hasta 60 °C y se empacó.

El tipo de goma se escogió teniendo en cuenta las características y propiedades de la goma y se optó por trabajar con agar porque las especificaciones del fabricante, menciona que se utiliza en presencia de altas concentraciones de azúcar, trabaja bien a temperaturas altas, evita la cristalización del azúcar y es útil en la elaboración de caramelos para dar la textura deseada. Se realizó ensayos previos con cuatro tipos de goma agar (Agar Agar 100 FCC/NF Powder, Agar Agar 100-44 HG, Agar Agar 150 FCC/NF Powder, 710 H-96 Powder), al elaborar el dulce de leche con cada una de ellas, la que brindó mejores características fue agar agar 100-44 HG y se trabajó con esta a diferentes concentraciones para determinar la más adecuada (0.1, 0.5 y 0.8%). De estas la proporción de 0.8% fue la que proporcionó las características deseadas del dulce de leche.

3.3.3. Selección del probiótico

Se empleó para este estudio *Lactobacillus casei* ya que, según estudios realizados por Homayouni *et al.*, (2008a) y Homayouni *et al.*, (2007), demostraron que es una cepa resistente en condiciones desfavorables tales como toxicidad del oxígeno y congelación. Además existe un creciente número de evidencia científica sobre sus efectos benéficos para la salud y, en la actualidad, las bacterias ácido lácticas son ampliamente utilizadas como probióticos en los alimentos y productos farmacéuticos (Sato *et al.*, 2012; Erdogrul y Erbilir, 2006).

3.3.4. Curva de crecimiento de *Lactobacillus casei*

Se utilizó *Lactobacillus casei*, ATCC 393 proveniente de “American Type Culture Collection”. Se realizó la respectiva curva de crecimiento para determinar las etapas logarítmicas de la bacteria, en MRS (Man, Rogosa y Sharpe) broth a 35°C. Se leyó la absorbancia a 600nm cada 6 horas y se sembró en medio agar MRS, en platos petri en duplicado. Las placas se incubaron (isotemp incubator) a 35 °C durante 48 horas.

3.3.5. Activación y recuperación del probiótico.

Lactobacillus casei, ATCC 393, se almacenó a una temperatura de -81 °C en glicerol, y se activó en caldo MRS (Man, Rogosa and Sharpe) a 35°C durante 15 a 18 horas (fase estacionaria) (Apéndice 8.3) bajo condiciones aeróbicas y agitación durante el periodo de incubación (C24 incubator shaker). Después del período de incubación, se transfirió a caldo MRS el 1% (v/v) del cultivo y se sometió a condiciones iguales para obtener la biomasa. Completado las 15 horas de incubación, se redujo la temperatura abruptamente a 4 °C, y posteriormente se separó por centrifugación (centrífuga 5417C - Eppendorf) a 14,000 xg (10,000 rpm), durante 10 minutos. La biomasa se lavó 3 veces con solución salina estéril al 0.85% p/v y se resuspendió en la misma solución, según lo reportado por (Guergoletto *et al.*, 2010; Pereira *et al.*, 2011; Sato *et al.*, 2012).

3.3.6. Inoculación del dulce de leche

Lactobacillus casei, ATCC 393, re-suspendido en solución salina, se adiciona al dulce de leche a una temperatura máxima de 40 °C. Se distribuyó el probiótico por agitación, luego se empacó en envases de plástico y se almacenó en nevera a 15 °C y 4 °C. Se utilizó la temperatura de 15 °C para evitar crecimiento de otras bacterias ácido lácticas, pues esta temperatura brinda un desarrollo selectivo de *Lactobacillus casei* (Champagne *et al*, 1997; LLC y VA, 2012; Ashraf y Shah, 2011).

3.4. Análisis proximal de los cuatro tratamientos de dulce de leche

3.4.1. Determinación de humedad.

Los crisoles, previamente marcados, se secaron a una temperatura de 100 °C en un horno por 24 horas. Se enfriaron en un desecador y se tomó su peso. El crisol fue tarado en una balanza (AG204, Mettler Toledo) y se le añadieron 5.0 gramos de muestra. Se colocó el crisol con la muestra en el horno al vacío (National Appliance Company 5851) a una temperatura entre 45 °C y 50 °C por 24 horas. Se sacó el crisol del horno al cabo de este tiempo y se dejó enfriar por 20 minutos en un desecador, se pesó y se registró el valor. Esto se realizó en triplicado para cada repetición de los tratamientos. La razón entre el agua extraída y el peso de la muestra húmeda es el porcentaje de humedad.

3.4.2. Determinación de cenizas

El material seco del análisis de humedad se utilizó para determinar ceniza siguiendo el método de la AOAC 923.03 (AOAC, 1998). Se seco los crisoles con tapa en el horno por 24 horas, se enfrió en el desecador y peso. Seguidamente se agregaron entre 0.5g a 1.0g de muestra seca a cada crisol. Se colocó el crisol con la muestra en una mufla (Muffle Furnance, Isotemp, Fisher Scientific, USA) y se calentó paulatinamente, aumentando la temperatura en tiempos de 30 minutos a 1 hora, hasta que alcanzó los 600°C. La temperatura se mantuvo a 600 °C por espacio de 12 horas, la mufla se apagó y se permitió que las muestras se enfriaran. Los crisoles se colocaron en un desecador y posteriormente se pesó con sus tapas. Este análisis se realizó en triplicado para cada repetición. La razón de peso de muestra remanente en el crisol entre el peso de la muestra seca es el porcentaje de ceniza en base seca.

3.4.3. Determinación proteína

El método utilizado para determinar proteína, fue el de Micro-Kjeldahl 991.20 (AOAC, 1998). Se pesó muestra seca entre 0.120g a 0.150g. Se transfirió a un tubo de digestión de 100 mL y se adicionó 0.6 g del catalizador (sulfato de potasio (K_2SO_4) y sulfato de cobre (Cu_2SO_4)) en cada tubo. Bajo la cámara extractora de gases se adicionó 7 ml de ácido sulfúrico concentrado a cada tubo y se colocó en el bloque de digestión (Digestion System 6, Tecator, Sweeden). Se aumentó la temperatura paulatinamente hasta alcanzar 350 °C aproximadamente. Las muestras se mantuvieron en el proceso de digestión por 4 horas. Cumplido este tiempo se sacaron los tubos y se dejaron enfriar dentro de la cámara de extracción.

La muestra digerida una vez fría se descargó en tubos de digestión grandes (250 mL) y se enjuagó en tubo de digestión con 40 ml de agua destilada y el enjuague se deposita en los tubos grandes. Además, se adicionó 50mL de NaOH al 40% p/v. Se encendió el destilador (Rapidstill II, Labconco, USA) y en el tubo de salida del destilador se colocó un matraz de 250ml con 25ml de solución de ácido bórico 4% (Kjendahl determination, Fisher Scientific, USA). Cuando el agua en el destilador alcanzó el punto de ebullición, rápidamente se colocó los tubos con la muestra y NaOH en el destilador por 10 minutos. La solución indicadora de ácido bórico se tornó de color verde después de haber pasado este tiempo. La muestra se tituló con HCL 0.10N y un color gris-lila mostró el punto de equivalencia. Esto se realizó en triplicado para cada repetición. Las fórmulas para obtener la cantidad de nitrógeno y el porcentaje de proteína en base seca son las siguientes:

$$\%N = \frac{\text{Volumen HCl utilizado en titulación (mL)} * \text{Normalidad HCl} * 14.01 * 100\%}{1000 * \text{peso muestra seca (g)}}$$

$$\%PRO = \% \text{ de N} * \text{Factor de conversión (6.38 productos lácteos)}$$

3.4.4. Determinación de Grasa

El contenido de grasa se determinó utilizando el método Mojonnier 989.05, (AOAC, 1998). Los recipientes de vidrio (cajas de vidrio petry), previamente marcados, se secaron a una temperatura de 100°C en un horno por 24 horas, se enfriaron en un desecador y se tomó su peso. Simultáneamente se pesó la muestra (aproximadamente) 5g en los frascos de Mojonnier y se añadió 2 ml de hidróxido de amonio (NH₄OH) y tres gotas de indicador fenolftaleína (0,5% w/v).

Se adicionó 10 ml de alcohol etílico, 25 ml de éter dietílico y 25 ml de éter de petróleo. Se agitó vigorosamente por un minuto después de cada una de las adiciones de reactivos a los frascos.

Se decantó la capa orgánica en cristales de vidrio, previamente pesados. Se realizaron dos extracciones adicionales utilizando 15 ml del éter dietílico y éter de petróleo.

Los recipientes de cristales con la capa orgánica, se colocaron en una hornilla para evaporar los solventes y luego en el horno por 5min, pasado este tiempo se colocaron en un desecador para enfriar y se pesaron ya fríos en una balanza analítica. La razón entre la grasa extraída y el peso de la muestra es el porcentaje de grasa.

3.5. Análisis físico químico

3.5.1. Determinación de color.

Se utilizó el colorímetro HunterLab MiniScan EZ, con iluminante D65 y un ángulo de observación de 10°. El colorímetro se calibró previamente a su uso empleando una placa negra y una placa blanca. Para cada muestra se obtuvo las variables L, a, b, del sistema de color de espacio polar CIE. El parámetro L indica variación en la luminosidad (variando desde 0% para negro y 100 % para blanco), a indica del mismo modo variación entre el verde (-a) y rojo (+a), b señala variación entre el azul (-b) y el amarillo (+b). Estos valores se convierten a Croma que corresponde a la saturación del color y Hue que corresponde al tono del color esto se realizó utilizando las siguientes ecuaciones(Mcguire, 1992):

$$L^* = L, a^*, b^*$$

$$C^* = \sqrt{(a^* * b^*) + (b^* * b^*)}$$

$$\theta = \tan^{-1} (b/a) / 6.2832 * 360^\circ$$

Si $a > 0$ y $b \geq 0$ entonces hue o tono = θ

3.5.2. °Brix

Se determinó los grados °Brix con un refractómetro manual (Fisher Scientific Handheld Refractometers) según AOAC 932.14 (AOAC, 1998), en el laboratorio de química a una temperatura promedio de 20 ± 4 °C, cada muestra se realizó por triplicado.

3.5.3. pH

Se realizaron determinaciones del potencial de hidrógeno (pH), mediante inmersión directa del electrodo al dulce de leche, utilizando el potenciómetro (Docu PHmeter- sartorios), el metro de pH, fue previamente calibrado con soluciones buffer 4, 7 y 10, siguiendo las instrucciones del manual. Estas determinaciones se realizaron por triplicado.

3.5.4. Actividad del agua (a_w)

Las mediciones de a_w se tomó a 25 °C con el instrumento AquaLab Series 4TE, basada en el método oficial de la AOAC 978.18 (AOAC, 1998). Antes de cada lectura se calibró con el estándar 0.760 NaCl (6 Molal).

3.5.5. Perfil de Textura

Se realizaron mediciones mediante el análisis de perfil de textura (TPA), usando un texturómetro TA-XT2i (Stable Micro Systems), provisto con una celda de carga de 50 kg y una sonda esférica de 20 mm de diámetro. Las condiciones de operación fueron: velocidad de pre-ensayo 5 mm/s, velocidad de ensayo 1mm/s, velocidad pos-ensayo 5mm/s, distancia 10mm y tiempo entre compresión 5seg. El texturómetro se calibró con un peso de 5kg. Se aplicó la secuencia de análisis de perfil de textura (compresión en dos ciclos), se evaluaron los parámetros instrumentales para la textura (dureza, elasticidad y adhesividad). Esta prueba se realizó por triplicado.

3.5.6. Viscosidad

La viscosidad del dulce de leche de las muestras, se midió utilizando un reómetro (Reological StressTech HR Stress – Controlled Rheometer) con accesorio de placas paralelas de 25mm. Se colocó las muestras en el equipo a temperatura constante de 25 °C y 15 °C y a una velocidad de corte de 10/s, dicha medida tardó 5 minutos en estabilizarse.

3.6. Análisis microbiológico

3.6.1. Enumeración de bacterias ácido lácticas en medio MRS

Se contó la cantidad de bacterias probióticas, usando el medio de cultivo MRS (Man, Rogosa y Sharpe), con muestreos cada 20 días, en diluciones seriadas de 10^{-5} - 10^{-9} al inicio del

proceso de almacenamiento y muestreos cada 10 días en diluciones de 10^{-1} - 10^{-6} cuando *Lactobacillus casei* se encontró en fase estacionaria. Se transfirió 1 ml de cada dilución en placas Petri estériles y se añadieron 20 ml de medio MRS, usando el método de vertido en placa, y se incubó (Fisher Scientific, Isotemp, Standard Lab Incubators) anaeróticamente a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ durante 48 horas por duplicado (Pereira *et al.*, 2011; Sato *et al.*, 2012).

3.6.2. Enumeración de mohos y levaduras en medio PDA

Los mohos y levaduras se enumeraron usando PDA (Potato Dextrose Agar) pH 3.5 ± 0.1 según la instrucción del fabricante. Los muestreos se realizaron cada 20 días con diluciones seriadas de 10^{-1} - 10^{-4} . Alícuotas de 1 ml se colocó en placas Petri estériles y se añadieron 20 ml de medio PDA, las placas en duplicado se incubaron (Isotemp Incubadora, Fisher Scientific) a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ durante 5 días.

3.6.3. Enumeración de mesófilos en medio PCA

En el dulce de leche los microorganismos aeróbicos mesófilos, se enumeraron usando PCA (Plate Count Agar). Se muestreo cada 20 días con diluciones seriadas de 10^{-1} - 10^{-4} . Alícuotas de 1 ml se colocaron en placas petri estériles y se añadieron 20 ml de medio PCA, las placas en duplicado se incubaron (Isotemp Incubadora, Fisher Scientific) a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ durante 48 horas.

3.6.4. Enumeración de coliformes totales en medio VRBA

La presencia de coliformes en dulce de leche, se enumeraron usando VRBA (Violet Red Bile Agar). Se muestreo al inicio (día cero) y al final (día 80) con diluciones desde 10^{-1} - 10^{-4} . Alícuotas de 1 ml se colocaron en placas petri estériles y se añadieron 20 ml de medio PCA, las placas en duplicado se incubaron (Isotemp Incubadora, Fisher Scientific) a $35^{\circ}\text{C} \pm 2$ durante 48 horas.

3.7. Análisis sensorial

3.7.1. Preparación de las muestras

Se prepararon 48 muestras de cada formulación de dulce (0% Leche/100%Suero, 25% leche/75% Suero, 50% Leche/50% Suero y 100% Leche/0%Suero), las cuales se empacaron en vasos de plásticos de 1 onza, en porciones iguales y se almaceno antes de la prueba a 25°C por 3 semanas (21 días), se marcó las muestras con codificación de tres dígitos aleatoriamente. Además se establecieron combinaciones completas y balanceadas de las muestras para dar igual oportunidad de ser observadas.

3.7.2. Procedimiento de la prueba

Se realizó una prueba de ordenamiento simple, en tres sesiones diferente, en las dos primeras secciones participaron 48 panelistas cada una y 45 panelistas en la última sección. Los

panelistas no fueron entrenados y participaron hombres y mujeres. Antes de la evaluación de la muestra, los panelistas recibieron instrucciones sobre el procedimiento de evaluación, tanto en formato escrito (Apéndice 9.5) y verbal. En la ejecución de la prueba, los panelistas permanecieron sentados en las cabinas de particiones y se les presentó las cuatro muestras de forma simultánea. Los panelistas degustaron las muestras a un ritmo auto-determinado, sin límite de tiempo, aunque las sesiones duraron de 5 – 10 minutos. Las evaluaciones se llevaron a cabo entre las 9 am a 12:00 m (Mielgaard *et al.*, 2006).

3.8. Análisis de datos

Los datos se analizaron utilizando un diseño de bloques completos al azar, ya que las características fisicoquímicas de la leche y el suero cambian con el transcurso del tiempo, y se trata de agrupar unidades experimentales homogéneas formando bloques.

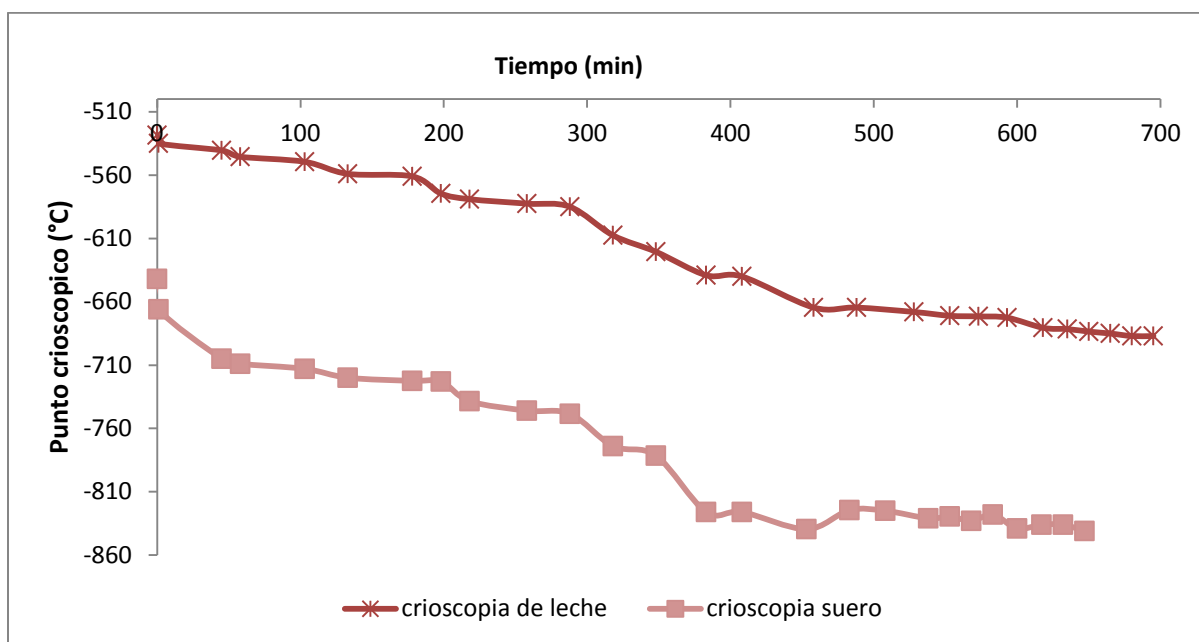
En el análisis sensorial se utilizó la prueba de Friedman, para determinar si hay o no diferencia y para determinar cuál de los tratamientos es diferente, se utilizó la prueba de Tukey.

Para las variables restantes se utilizó valores de media y sus desviaciones estándar (*S*) para determinar la exactitud de las medidas. Se analizó como un modelo lineal mixto para determinar la diferencia entre tratamientos según corresponda el caso con un 95% de confianza ($\alpha = 0.05$) y se realizó una comparación de medias utilizando el LSD Fisher. Se utilizó el programa de InfoStat (InfoStat Software Estadístico, 2008) para el análisis de los datos.

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Hidrólisis de lactosa

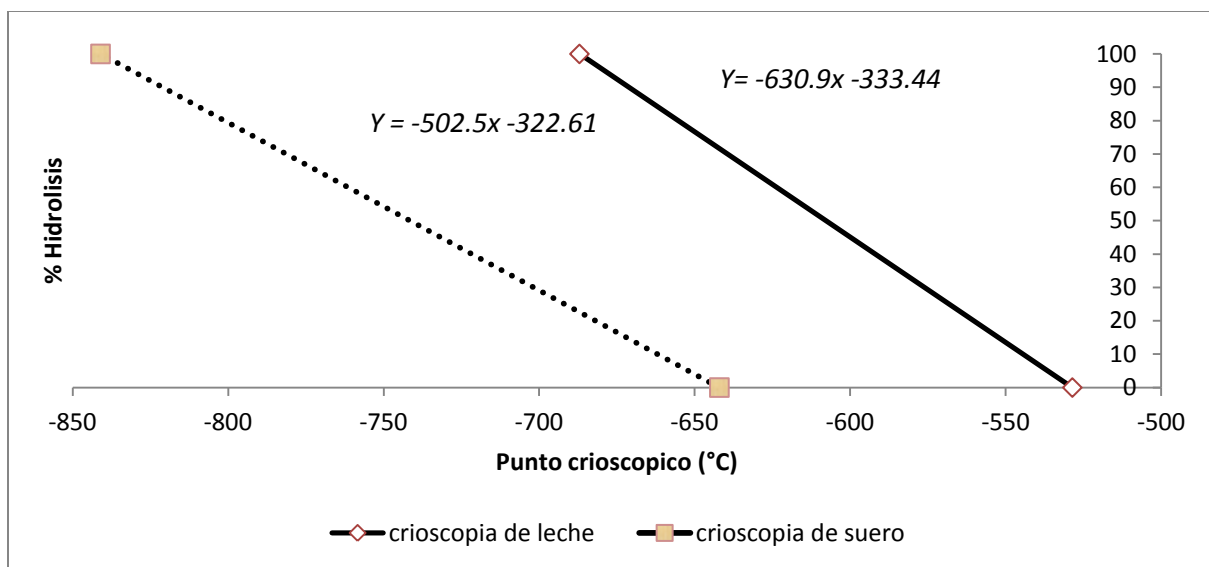
En este estudio se preparo leche deslactosada, para determinar la cantidad de enzima requerida para la hidrólisis de la leche en un 40% se utilizo un crioscopio. La leche por poseer numerosas sustancias en solución, tiene un punto de congelación inferior al del agua. Su valor promedio es de -0.525°C y se considera una constante fisiológica que varía en límites muy reducidos (-0.515 a -0.530°C) (Henno *et al.*, 2008). En la Tabla 5 se observa que la leche utilizada en esta investigación se encuentra cercana en este rango con -0.529°C .



Gráfica 1. Hidrólisis de lactosa utilizando la enzima lactasa, para suero y leche

Aldana, (2009) y Klein *et al.* (2010), utilizaron el punto crioscópico como punto de referencia para determinar el grado de hidrólisis de la lactosa, pues el descenso crioscópico normal observado en la leche (Gráfica 1), se debe principalmente a la lactosa y sales minerales que se encuentran en solución. La grasa y las proteínas no influyen significativamente sobre estas propiedades (Henno *et al.*, 2008; Pinkerton y Peters, 1958). Además, la conductividad específica de la leche varía inversamente proporcional con el contenido de la lactosa (Pinkerton y Peters, 1958).

La hidrólisis de lactosa en glucosa y galactosa promueve la formación de un mayor número de moléculas de soluto originadas y a su vez baja el punto de congelación. La curva de la gráfica 1, permite establecer un 0% de hidrólisis en el punto crioscópico inicial (-0.528°C y -0.642°C para leche y suero, respectivamente) y un 100% de hidrólisis en el punto final (cuando la medida se torna constante se considera una hidrólisis total de lactosa). De la gráfica 2, se logró establecer el punto crioscópico y el tiempo aproximado para obtener una hidrólisis de la lactosa del 40% recomendada para controlar el problema de formación de arenosidad por cristalización de la lactosa (Sabioni *et al.*, 1984; Aldana, 2009). Con la adición de 0.3 g/L de la enzima lactasa e incubación a $38 - 40^{\circ}\text{C}$ durante 3 horas, se obtuvo aproximadamente una hidrólisis de 40%, caracterizado por el punto crioscópico de -0.721°C y -0.592°C a un tiempo de 133 – 178 minutos y 288 – 318 minutos para suero ácido y leche respectivamente (Tabla 5).



Gráfica 2. Porcentaje de hidrólisis de lactosa

Para usar el método crioscópico, hay que tener cierto control al momento de realizar la prueba ya que la acidificación debido a la fermentación de la lactosa, aumenta el descenso del punto de congelación. Por esta razón el método crioscópico sólo puede ser aplicado a la leche fresca, con una acidez no mayor de 0.18% o no más de 5×10^6 bacterias/mL (Henno *et al.*, 2008; Shipe, 1959).

Tabla. 5. Porcentaje de hidrólisis de la lactosa.

% hidrolisis	Temperatura °C		Tiempo min	
	Suero	leche	Suero	leche
0	-0.642	-0.528.5	0	0
40	-0.721*	-0.592*	133 - 178	288 - 318
100	-0.841	-0.687	647	695

*datos calculados con base en la ecuación de la gráfica 2

4.1.1. Proporción de las mezclas de los tratamientos de dulce de leche

En la Tabla 6 se observa la proporción de suero neutralizado y deslactosado, y leche deslactosada para cada tratamiento y la cantidad de goma, la cual se adicionó proporcionalmente al cantidad de suero en el producto, teniendo como base a utilizar 0.8% para el tratamiento que posee 100% suero.

Para determinar el tipo de goma y las concentración más adecuada, se evaluaron 4 tipos de gomas (Agar Agar 100 FCC/NF Powder, Agar Agar 100-44 HG, Agar Agar 150 FCC/NF Powder, 710 H-96 Powder), y a diferentes concentraciones (0.1, 0.5 y 0.8%), el Agar Agar 100-44 HG presentó buenas características para el dulce de leche a una proporción de 0.8% para dulce del leche con 100% suero ácido.

El suero ácido por su bajo contenido de sólidos 5.7 – 6% (Wit, 2001), para elaborar el dulce de leche fue necesario utilizar goma, para conseguir las características deseadas de textura, ya que las gomas son un ingrediente alimentario ampliamente utilizado, principalmente por sus propiedades espesantes y estabilizantes (Zimmermann, 2007).

Tabla. 6. Análisis de las cuatro formulaciones del dulce de leche parcialmente sustituido por suero.

Tratamiento	Cantidad de suero ácido %	Cantidad de leche %	Azúcar (sacarosa) %
1	100	0	18
2	75	25	
3	50	50	
4	0	100	

4.2. Análisis proximal de dulce de leche de los cuatro tratamientos.

4.2.1. Humedad

La Tabla 1 muestra los requisitos fisicoquímicos del dulce de leche donde se observa que la humedad máxima es de 30%. Los resultados obtenidos en esta investigación (Tabla 7), se encuentran dentro de los rangos establecidos de humedad, los cuales deben ser menores de 30%. Aunque hubo tratamientos con humedad muy bajos como 100% y 75% suero con 17 ± 1 comparado con los tratamientos 0% y 50% que contienen 24.1 y 20.4 de humedad, respectivamente. Se observó que la relación del contenido de suero con la humedad es inversamente proporcional, a mayor contenido de suero menor es la humedad. Pieretti *et al.* (2012) en la elaboración de dulce de leche con diferentes concentraciones de azúcar morena observó que la humedad disminuye a contenidos mayores de azúcar. Efecto contrario se obtuvo en la elaboración de dulce de leche parcialmente sustituido por suero con sabor a café, donde a mayor sustitución de suero, el contenido de humedad aumenta, mientras que con la adición de café la humedad se reduce (Ferreira *et al.*, 2012). Madrona *et al.* (2009) y Días *et al.* (2008) obtuvieron un comportamiento similar en dulce de leche sustituido parcialmente por suero lácteo; a mayor contenido de suero lácteo, la humedad se incrementa.

En estudios de dulce de leche elaborado con goma Xantan y proteína concentrada de suero, observaron que la adición de goma ayuda a retener humedad en el producto (Zimmermann *et al.*, 2007; Armisen y Galatas, 2009). Esto explicaría el bajo contenido de humedad en la presente investigación de los productos que tienen mayor cantidad de goma, ya que el contenido

de goma está en base al contenido de suero, por lo que, a mayor proporción de suero, mayor fue la adición de goma.

En muestras de dulce de leche comerciales, el rango del contenido de humedad de los valores oscila desde 19.0 hasta 37.2% (Demiate *et al.*, 2001; Evangelista *et al.*, 2010). Por tanto, los valores obtenidos en este estudio fueron de 16.8 a 24.1, están dentro de este rango (Tabla 7).

Los carbohidratos, son los componentes principales de los sólidos totales en el dulce de leche y presentan una correlación inversamente proporcional al contenido de humedad (Zimmermann *et al.*, 2007; Andrade *et al.*, 2009). Zimmermann *et al.* (2007) evaluó la composición química del dulce de leche con goma xantan como sustituto parcial de la sacarosa y almidón. Encontró que las muestras con mayor contenido de sacarosa presentan menor contenido de humedad.

Tabla. 7. Estadística del análisis proximal a los cuatro tratamientos de dulce de leche elaborado con suero en base húmeda.

TRATAMIENTO	Humedad	Ceniza	Grasa	Proteína	Carbohidratos
100	16.8 ^c ± 0.7	2.3 ^a ± 0.1	7.8 ^a ± 0.2	1.0 ^d ± 0.2	72.1 ^a ± 0.8
75	17.1 ^c ± 0.6	2.4 ^a ± 0.1	6.8 ^b ± 0.2	2.8 ^c ± 0.2	70.9 ^a ± 0.8
50	20.4 ^b ± 0.6	2.0 ^b ± 0.1	6.1 ^b ± 0.2	5.2 ^b ± 0.2	66.2 ^b ± 0.8
0	24.1 ^a ± 0.6	1.8 ^b ± 0.1	6.9 ^b ± 0.3	7.4 ^a ± 0.3	59.7 ^c ± 0.9

Medias con la misma letra en la columna no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

4.2.2. Proteína

Los valores de proteína obtenidos se comportan inversamente proporcional al contenido de suero, se observa que hay diferencia significativa entre los tratamientos ($p < 0.05$). El tratamiento con menor contenido de proteína es el de 100% suero con $1 \pm 0.2\%$ y el tratamiento con mayor contenido de proteína es de 0% suero con $6.7 \pm 0.2\%$ (Tabla 7). Comportamiento

similar tuvieron Ferreira *et al.*, (2012) y Madrona *et al.* (2009) donde las muestras de dulce de leche con mayor contenido de suero obtuvieron menor contenido de proteína. Esto debido a que la leche contiene 3 – 3.3% de proteína de los cuales aproximadamente 0.6 – 0.7% hacen parte de la proteína del suero (Wit, 2001), es por eso que, productos a base de leche al concentrarse, presentan mayor contenido de proteína, caso contrario en productos a base de suero donde el contenido de proteína menor.

EL dulces de leche elaborados con tecnología tradicional, es decir, usando leche bovina, sacarosa y bicarbonato de sodio, presentan un contenido promedio de proteínas de 6.0 %. (Perrone, 2006).

4.2.3. Grasa

El contenido de grasa no presenta diferencias significativas ($p>0.05$) para los tratamientos con menor contenido de suero (75, 50 y 0%) (Tabla 7). Resultados similares observó Madrona *et al.*, (2009) al no encontrar diferencias significativas en el contenido de grasa cuando se sustituye el contenido de suero en el dulce de leche, resultado de la estandarización de la grasa en la mezcla previo a la manufactura del dulce de leche.

Aunque la mezcla de suero + leche, inicialmente se estandarizó a 3.6% para todos los tratamientos, el tratamiento 100% suero contiene mayor grasa y presenta diferencia significativa ($p<0.05$).

4.2.4. Ceniza

El contenido de ceniza para el dulce de leche con suero 100% y 75% es de $2.3 \pm 0.1\%$ y $2.4 \pm 0.1\%$ respectivamente, (Tabla 7). Dichos valores están sobre los límites requeridos según las normas para el dulce de leche tradicional (Tabla 1), el cual no debe ser mayor del 2% (Código Alimentario Argentino, 2010; NTC, 2008; ANVS Brasil, 1978). Ferreira *et al.* (2012), Madrona *et al.* (2009) y Demiate *et al.* (2001), obtuvieron el mismo comportamiento en dulce de leche sustituido parcialmente con suero lácteo y Ferreira *et al.* (2012) atribuye esto a la adición de bicarbonato de sodio.

Los tratamientos con mayor contenido de leche (50 y 0% suero) están dentro del rango establecido por las normas (Tabla1).

Teniendo en cuenta las especificaciones del suplidor de la goma utilizada en este estudio en la elaboración del dulce de leche (Agar Agar 100-44 HG), ésta, aporta ceniza en un total de 626mg/100g (Na= 487mg, K= 30mg, Ca = 109mg). La cantidad de goma que se adicionó a cada tratamiento se hizo teniendo en cuenta la proporción de suero. Es por eso que tratamientos con mayor contenido de suero, tal como lo es el caso de 100% y 75%, presentan valores con mayor contenido de ceniza (Tabla 7); los cuales están por encima de lo estipulado por las normas (Tabla1).

El contenido de ceniza no se ve influenciado por la sustitución de carbohidratos (Queiroz *et al.*, 2009),. Sin embargo, Pieretti *et al.* (2012), recomienda que es importante utilizar un azúcar de buena calidad, para proporcionar bajo contenido en cenizas debido a que altos niveles de

ceniza significa alto contenido en potasio; lo que da un sabor desagradable al azúcar y a sus productos.

4.2.5. Carbohidratos

Aunque la cantidad de sacarosa añadida a las distintas formulaciones de dulce de leche fue igual, el contenido total de azúcar entre los tratamientos varía o muestran una diferencia significativa ($p < 0.05$), que oscilan entre 59.9 a 72.1% (Tabla 7). Los carbohidratos dependen en su mayoría del contenido de humedad del producto por lo que a menor humedad mayor concentración de los azúcares. Además en la Tabla 10, se observa mayor contenido de °Brix para los tratamientos 100 y 75% suero que a su vez tienen la mayor cantidad de carbohidratos, aunque la presencia de carbohidratos también depende de la composición del producto. Ferreira *et al.* (2012) tuvo valores similares de carbohidratos en dulce de leche elaborado a base de suero lácteo y café.

Los carbohidratos son el componente principal en el dulce de leche. El contenido de lactosa, glucosa y sacarosa en 42 muestras de dulce de leche tradicional se encuentra desde 4.7 a 12.7%, 0.4 a 3.9% y 32.7 a 56.6%, respectivamente (Demiate *et al.*, 2001) y el contenido de carbohidratos incide directamente en el contenido de humedad (Zimmermann *et al.*, 2007; Andrade *et al.*, 2009). Pieretti *et al.* (2012), en la elaboración de dulce de leche con diferentes concentraciones de azúcar morena, observó que la humedad disminuye a contenidos mayores de azúcar.

4.3. Perfil fisicoquímico de los cuatro tratamientos del dulce de leche

4.3.1. Análisis de color

Hay tres características de la luz con la que se puede especificar un color (Figura 4): Hue ($^{\circ}\text{H}$) (tono o ángulo de matiz), saturación o croma (C_{ab}) y luminosidad (L). Matiz ($^{\circ}\text{H}$) es un atributo asociado con la longitud de onda dominante en una mezcla de ondas de luz, es decir, que representa el color dominante como es percibido por un observador. Sus valores son de 0 a 360° . Saturación (C_{ab}) se refiere a pureza o intensidad de un color particular y puede también ser definido por la cantidad de gris que contiene un tono, sus valores son de 0 a 100. L indica la luminosidad, que encarna la idea de la intensidad cromática y toma valores de 0 a 100 (Mcguire, 1992; Jha, 2010).



Figura 4. Características del color Matiz ($^{\circ}\text{H}$), Saturación (C_{ab}) y L (luminosidad).

Con respecto al color (Tabla 8) se observó diferencia significativa ($p < 0.05$), con relación a la luminosidad (L). Los tratamientos 100% y 75% presentan valores de L bajos que resultan a un tono de color más oscuro. Esto se debe a que estas mezclas tienen mayor contenido de suero lácteo, lo que se traduce a un menor contenido de sólidos y a su vez mayor cantidad de lactosa.

El menor contenido de sólidos hace que primeramente se prolongue el tiempo de cocción y se potencialice la reacción de Maillard; la cual es responsable de los atributos característicos como color marrón típico, textura cremosa y aroma agradable similar al caramelo (Perrone, 2006). Además, contiene mayor presencia de azúcares reductoras como glucosa y galactosa resultado de la hidrólisis, juntas tienen mayor poder reductor de la lactosa y causan un pardeamiento no enzimático acelerado durante la fabricación de dulce (Sabioni *et al.*, 1984).

En términos generales las diferencias en color en el producto final pueden ser producto de varios factores, incluyendo: la acidez inicial de la leche, la cantidad y el momento de la adición de bicarbonato de sodio, la presencia de azúcares reductoras de la lactosa, el tiempo dedicado a la evaporación y el contenido de a_w (Ferreira *et al.*, 2012a; Giménez *et al.*, 2008^a; Morgan *et al.*, 2005).

En un trabajo realizado por Ferreira *et al.* (2012a) a cuatro tipos de dulce de leche comerciales, L tomó valores de 53.16 a 59.60, obteniendo un dulce de leche con mayor luminosidad (L) en comparación al obtenido en este experimento donde L osciló entre 26.77 ± 0.5 a 34.26 ± 0.61 . En otro estudio realizado por (Ferreira *et al.*, 2012b) evaluó las características fisicoquímicas y sensoriales del dulce de leche elaborado con suero de leche y extracto hidrosoluble de soya, los valores de L estuvieron en un rango entre 22.61 a 25.79, siendo así un producto más oscuro coincidiendo con los valores obtenidos en esta investigación.

Con respecto Matiz ($^{\circ}\text{H}$) se observó que sus valores estuvieron entre 49° a 60° (Tabla 8) con una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre tratamiento que, según la Figura 4, estaría en la tonalidad de amarillo. Además teniendo en cuenta los valores de Saturación (C_{ab}) que estuvieron entre 12.65 a 16.75 (Tabla 8), se puede aludir la coloración caramelo poco saturada ya que a valores cercanos a cero menos saturado será el color del producto (Figura 5).

Tabla. 8. Análisis del color de los cuatro tratamientos del dulce de leche a base de suero.

TRATAMIENTO	L	Matiz ($^{\circ}\text{H}$)	Saturación o Cromo (C_{ab})
100	$26.98^b \pm 0.50$	$60.23^a \pm 0.11$	$12.65^b \pm 0.32$
75	$26.77^b \pm 0.50$	$49.94^c \pm 0.11$	$15.97^a \pm 0.32$
50	$33.92^a \pm 0.50$	$50.03^c \pm 0.11$	$16.75^a \pm 0.32$
0	$34.26^a \pm 0.61$	$51.25^b \pm 0.14$	$16.32^a \pm 0.39$

Medias con la misma letra en la columna no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

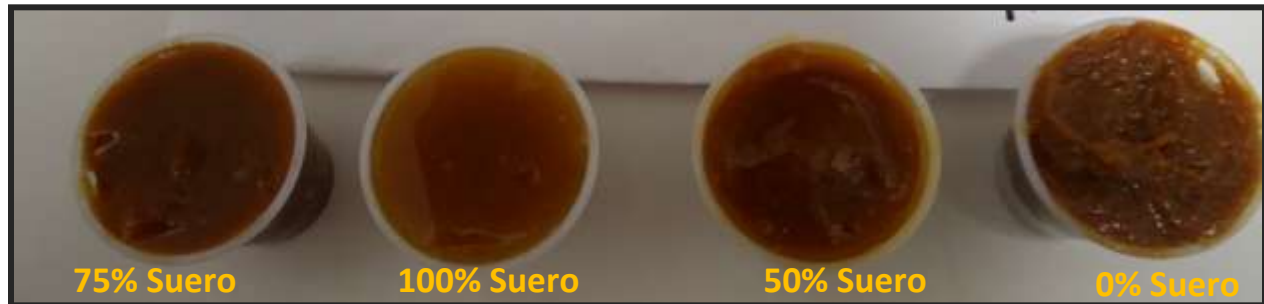
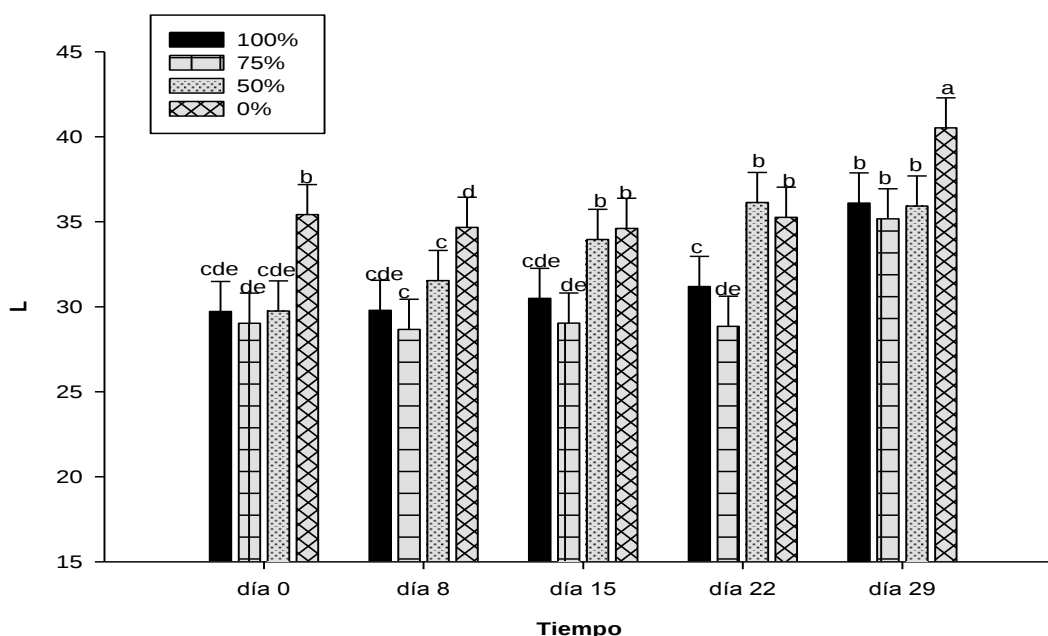


Figura 5. Color de los cuatro tratamientos de dulce de leche.

Tabla. 9. Interacción tratamiento tiempo del análisis estadístico de L, Matiz ($^{\circ}\text{H}$) y Saturación (C_{ab})

	<i>F-value</i>	<i>p-value</i>
Saturación	0.69	0.7627
Matiz ($^{\circ}\text{H}$)	0.40	0.9623
L	2.45	0.0058

En la Tabla 9, se muestran los resultados obtenidos del análisis estadístico y se puede observar que la interacción tratamiento – tiempo para saturación C_{ab}) y matiz ($^{\circ}H$) no presenta diferencia significativa, por lo que se concluye, que no hay cambios significativos en el tiempo con respecto al tono y saturación del color del dulce de leche independientemente del tratamiento. Sin embargo se observa que L tiene estadísticamente una diferencia significativa ($p < 0.05$) (Tabla 9).



Gráfica 3. Comportamiento de L en el almacenamiento a 25 °C, para los cuatro tratamientos de dulce de leche con suero ácido. Letras diferentes para un mismo tratamiento en cada día, presentan diferencia significativa ($p < 0.05$).

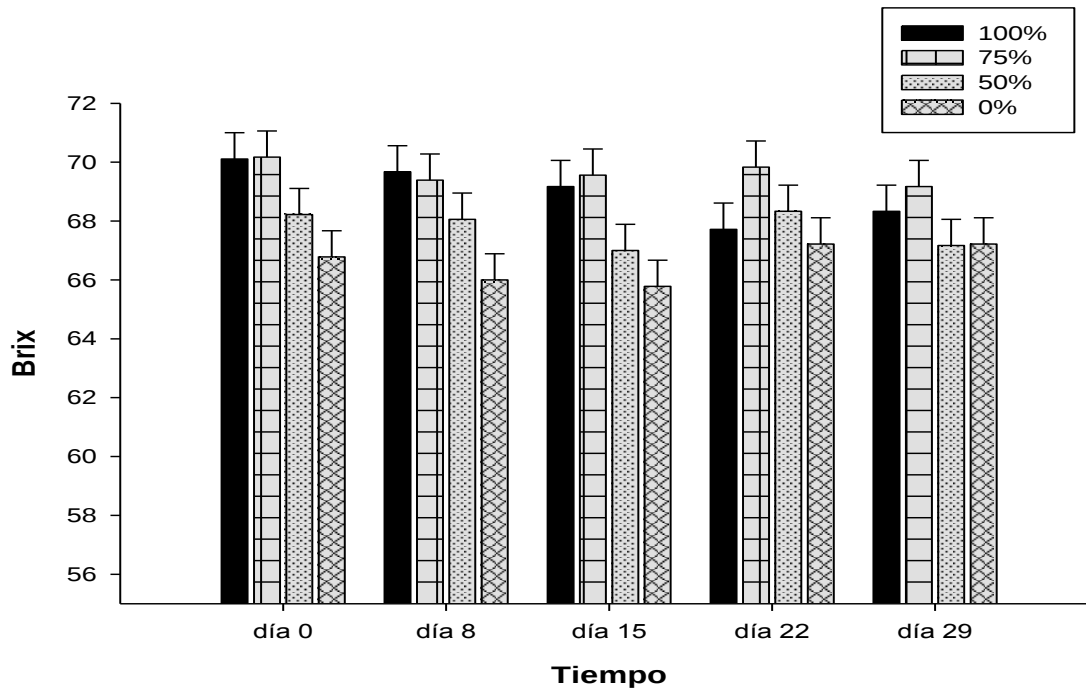
La luminosidad (L), con respecto al tiempo de almacenamiento, se observa que todos los tratamientos tienden a aumentar, este comportamiento se puede observar con mayor intensidad para el tratamiento con 0% suero (Gráfica 3). Aunque este cambio no es perceptible a simple vista, existe diferencia estadística significativa ($p > 0.05$).

La caramelización y reacciones de Maillard durante el almacenamiento, pueden seguir ocurriendo, lo que explicaría el cambio en la luminosidad (Garitta *et al.*, 2004).

4.3.2. °Brix

En el comportamiento del perfil químico de los cuatro tratamientos de dulce de leche elaborado con suero (Tabla 10) se observa que en el contenido de los sólidos solubles totales existe una diferencia significativa ($p < 0.05$). Esto podría ser resultado del contenido de suero, ya que los tratamientos con mayor contenido de suero, poseen menor cantidad de sólidos, aproximadamente 6.5g/100ml (Wit, 2001), lo que hace que al momento de retirar el producto de la cocción, el que tiene mayor contenido de suero se evapore más rápidamente, porque contiene mayor agua libre, y hace que se concentren mas y a la vez los °Brix aumentan; por lo que se observa que el tratamiento 100% y 75% suero tienen un contenido mayor en °Brix en comparación con el de 0% suero.

En la interacción tratamiento – tiempo con respecto a los °Brix (Gráfica 4), se observa que no hay diferencia significativa ($p > 0.05$), entre los tratamientos.



Gráfica 4. Comportamiento del los °Brix en el almacenamiento a 25 °C, para los cuatro tratamientos de dulce de leche con suero ácido.

Además, se observó, que el contenido de °Brix (Tabla 7), en el dulce de leche es inversamente proporcional al contenido de humedad y directamente proporcional al contenido de suero. Esto debido a que los productos con mayor contenido de suero deben de concentrarse por más tiempo para alcanzar la textura deseada, que a su vez reduce la humedad y aumentan el °Brix.

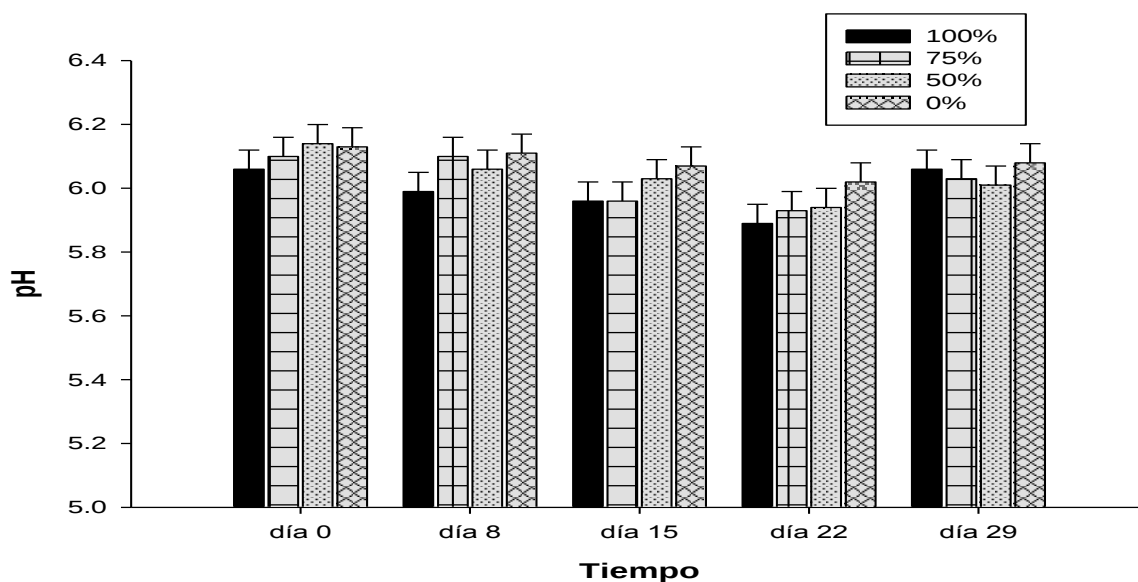
Tabla. 10. Perfil químico de los cuatro tratamientos del dulce de leche

TRATAMIENTO%	°Brix	Aw	pH
100	70.50 ^b ± 0.2	0.72 ^c ± 0.01	6.16 ^a ± 0.01
75	71.17 ^a ± 0.2	0.71 ^c ± 0.01	6.08 ^c ± 0.01
50	65.67 ^c ± 0.2	0.77 ^b ± 0.01	6.12 ^b ± 0.01
0	65.00 ^c ± 0.2	0.79 ^a ± 0.01	6.09 ^{bc} ± 0.01

Medias con la misma letra en la columna no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

4.3.3. pH

Estadísticamente no presenta diferencia significativa ($p>0.05$). Para todos los tratamientos se utilizó la misma materia prima, y para cada bloque o repetición se trato de trabajar con los mismos estándares, por lo que se espera que el pH de los cuatro tratamientos no hayan presentado diferencias significativas (Tabla 10), los valores oscilan entre 6.08 ± 0.01 y 6.16 ± 0.01 . Estos valores coinciden con los obtenidos en una investigación, que buscaron observar el efecto del pH y la temperatura sobre el comportamiento reológico de dulce de leche tradicional, dicho valor de pH estuvo alrededor de 6.1 (Rovedo, Viollaz, & Suarez, 1991). En otro estudio de análisis físico químico y sensorial del dulce del leche sin sacarosa los valores de pH encontrados oscilan entre 6.22 a 6.39 (Milagres *et al.*, 2010). La Gráfica 5 muestra la interacción del tratamiento con respecto al tiempo, lo cual no presentó diferencia significativa ($P>0.05$), aunque su tendencia es a disminuir.



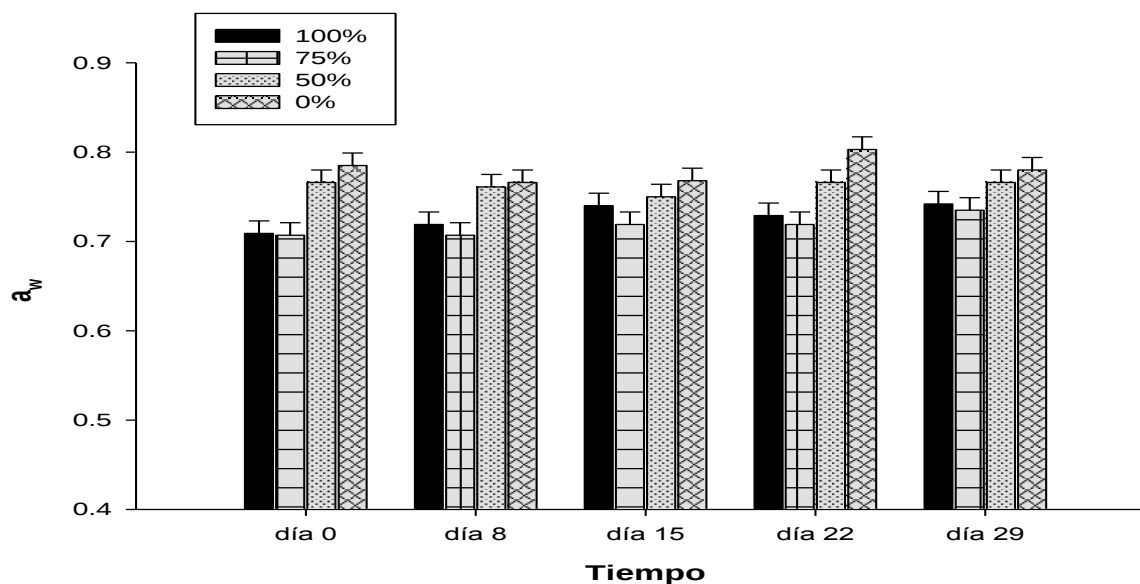
Gráfica 5. Comportamiento del pH en almacenamiento, para los cuatro tratamientos de dulce de leche con suero ácido almacenados a 25 °C.

4.3.4. a_w

La actividad de agua se define como la humedad relativa en equilibrio de un producto dividido entre 100 (Kilcast and Subramaniam, 2000), la medida va de 0 a 1. La mayoría de los organismos que causan deterioro tiene dificultad para desarrollarse a bajo a_w , como las levaduras y hongos que requieren un a_w 0.85 y 0.70, respectivamente (Correia-Oliveira *et al.*, 2008). En general, se puede considerar que un alimento estable es cuando la actividad de agua es inferior a 0.60. En la Tabla 10 se observa que hay una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre tratamientos y que el tratamiento con mayor a_w (0.79 ± 0.01) es el de 0% suero que a su vez tuvo menor °Brix (65.0 ± 0.2).

Un comportamiento similar observó Milagres *et al.* (2010) donde la actividad de agua está relacionada directamente con el contenido de °Brix. La actividad de agua depende también de la temperatura dado que ésta influye sobre la presión de vapor de agua de las soluciones, pero el efecto es pequeño en la mayoría de los solutos salvo si la solución es saturada. En tales casos, la cantidad de algunas sustancias de la solución y, por tanto, el a_w pueden variar marcadamente con la temperatura (Correia-Oliveira *et al.*, 2008).

La actividad de agua del dulce de leche elaborado con suero y parcialmente sustituido con leche, estuvo en el rango de 0.71 ± 0.01 a 0.79 ± 0.01 . Estos valores coinciden con los valores obtenidos en un trabajo realizado por Morgan *et al.* (2005) y Rodríguez *et al.* (2012) donde mencionan que la actividad de agua del dulce de leche está por debajo de 0.85.



Gráfica 6. Comportamiento de la actividad de agua a_w en el almacenamiento, para los cuatro tratamientos de dulce de leche con suero ácido almacenados a 25 °C.

Analizando el comportamiento de la actividad de agua con respecto al tiempo de almacenamiento (Gráfica 6) se observó que con el paso del tiempo la actividad de agua (a_w), aumenta para los cuatro tratamientos. Sin embargo no hay una diferencia significativa ($p>0.05$). Además los tratamientos con mayor contenido de suero 100% y 75% presentan mayor aumento del a_w con el paso del tiempo. Lo que hace que este producto sea más vulnerable al ataque de microorganismos y deterioro de sus características físicas y sensoriales. En un estudio se evaluó los atributos de calidad del dulce de leche tradicional existente en el mercado y se obtuvo que la actividad de agua se encuentra entre 0.85 y 0.91 (Ferreira *et al.*, 2012a). Por otra parte, en otra investigación se elaboró dulce de leche parcialmente sustituido por suero lácteo y se obtuvo una actividad de agua entre 0.79 (50% leche y 50% suero) y 0.82 (productos con mayor contenido de leche) (Ferreira *et al.*, 2012b). Este presenta un comportamiento similar de los tratamientos realizados en esta investigación donde a mayor concentración de suero el a_w es más bajo

comparado a los tratamientos con mayor contenido leche. La alta concentración de solutos (carbohidratos) en el dulce de leche normalmente se obtiene un producto con una a_{wik} por debajo de 0.85% (Ferreira *et al.*, 2012b).

4.3.5 Análisis de textura

4.3.5.1. Dureza

Las propiedades reológicas determinan la textura del producto, lo que afecta la percepción sensorial y, en última instancia, la aceptación del producto por el consumidor (Garitta *et al.*, 2004; Zimmermann, 2007).

En la Tabla 11, se muestra el comportamiento de dureza del dulce de leche según el tratamiento y se observó que la diferencia es significativa entre tratamientos ($p < 0.05$). La dureza aumenta según aumenta la cantidad de leche y proteína. Este comportamiento es inversamente proporcional al contenido de suero lácteo. Los tratamientos 100% y 75% son más parecidos entre sí en cuanto a la dureza con valores de 10.45, 10.80 Kg mm/s^2 respectivamente y el tratamiento 50% obtuvo valores de 17.96, donde se observó que a mayor concentración de leche mayor dureza.

El dulce de leche con 0% suero (100% leche) posee valores de 56.89 Kg mm/s^2 , la cual es aproximadamente cinco veces mayor que las muestras con suero. Esto se podría atribuir a que la leche contiene mayor cantidad de sólidos como las proteínas, ya que el contenido de sólidos

están alrededor de 13% para la leche y 7% el suero (Wit, 2001). Los sólidos de la leche le ayudan a dar más cuerpo al producto y alcanzar la consistencia deseada en menos tiempo de cocción. En el caso de las muestras elaboradas con suero la contextura se la da la goma en su mayoría y los pocos sólidos que este posee.

Ferreira *et al.*, (2012) en el estudio de dulce de leche parcialmente sustituido por suero, se realiza un análisis de perfil de textura (TPA) y con respecto a la dureza que está entre 138.4 y 207 Kg --mm/s^2 , la cual está muy por encima de los valores encontrados en este estudio.

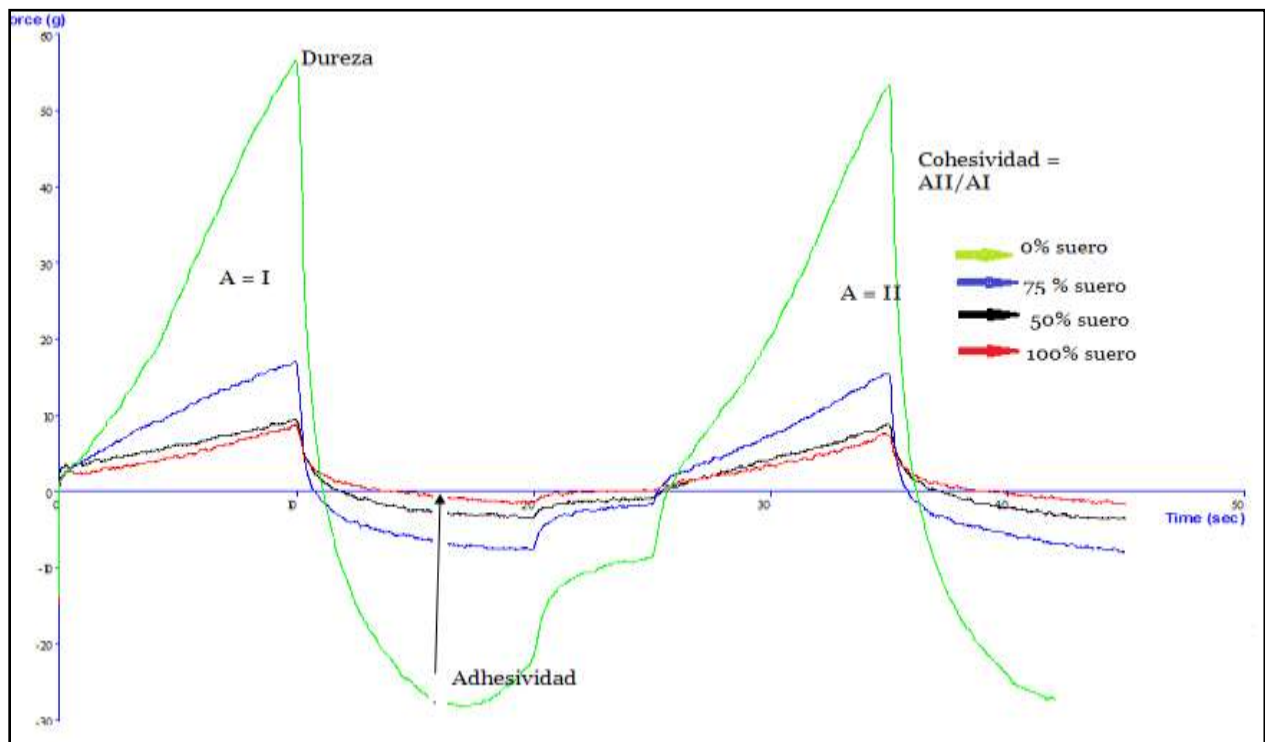
La dureza del dulce de leche comercial (100% leche) posee valores de 66.70 – 206.46 Kg --mm/s^2 , (Ferreira *et al.*, 2012a; Ferreira *et al.*, 2012b). Estos valores coinciden con los encontrados en esta investigación para el tratamiento 0% suero.

En el análisis estadístico para la prueba instrumental, tomando como factor el tiempo de almacenamiento (0, 8, 15, 22 y 29 días), mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) (Gráfica 8). En la dureza con respecto al periodo de almacenamiento. Se puede observar que, la dureza se aumenta progresivamente para todos los tratamientos.

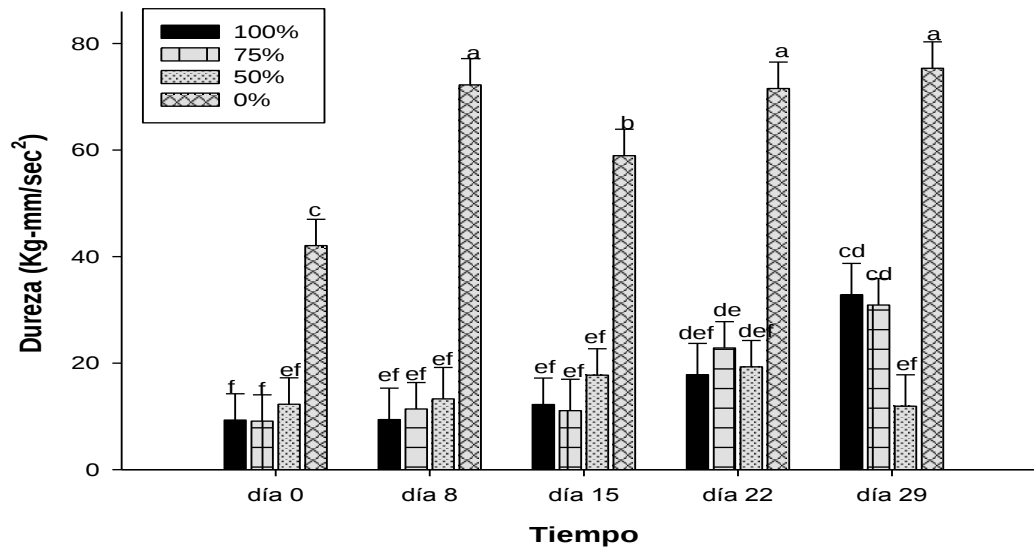
Los tratamientos 100% y 75% son los que representan mayores cambios con el tiempo de almacenamiento. Al final de su procesamiento, el dulce de leche constituye una solución sobresaturada de lactosa porque solo se hidroliza aproximadamente un 40%. La presencia de este azúcar va a influir fuertemente en la textura del producto final, ya que la cristalización en solución por su baja solubilidad es un fenómeno inevitable. Cualquier solución, al ser concentrada, tiende a tornarse sobresaturada o puede dar como resultado la precipitación (cristalización) del soluto durante el enfriamiento. Si el dulce de leche es almacenado por un

tiempo prolongado, los pequeños cristales de lactosa, imperceptibles en el envasado, aumentan de tamaño o se agrupan en núcleos formando cristales perceptibles al paladar que le dan al producto aspecto y textura arenosa desagradable (Perrone, 2006). Un comportamiento similar observó Andrade *et al.* (2009).

En la Tabla 7, se observa que las muestras 100, 75 y 50% suero son los que presentaron un menor contenido de humedad, que a su vez están más concentrados. Demiate y Konkel (2001), manifiestan que la baja humedad en el dulce de leche mejora la conservación del producto de ataques microbiológicos pero facilita la aparición de contextura arenosa. Y como la arenosidad avanza con el tiempo, la dureza también aumenta con el almacenamiento.



Gráfica 7. Comportamiento de la prueba de dos ciclos o del perfil de textura (TPA) para los cuatro tratamientos de dulce de leche parcialmente sustituido con suero lácteo.



Gráfica 8. Comportamiento de la dureza de los cuatro tratamientos del dulce de leche parcialmente sustituido con suero almacenado a 25 °C. Letras diferentes para un mismo tratamiento en cada días, presentan diferencia significativa ($p < 0.05$).

4.3.5.2. Adhesividad

La prueba de dos ciclos o perfil de textura (TPA) trata de simular el comportamiento de masticar el alimento dos veces. Cada ciclo de la prueba semeja un ciclo de cerrar y abrir de la quijada (Mielgaard *et al.*, 2006).

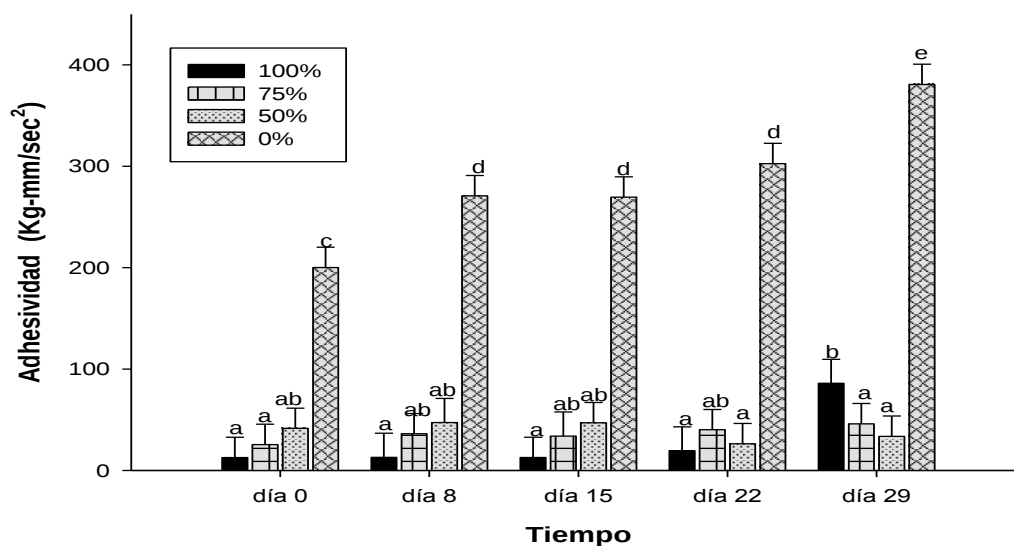
La adhesividad se refiere a la fuerza necesaria para separar los dientes luego de masticar la muestra. Típicamente se evalúa en la primera mordida. También se considera adhesividad de la masa si la muestra se adhiere al paladar o los dientes (Mielgaard *et al.*, 2006).

Adhesividad se mide como el área del pico negativo por debajo de la línea de base (Gráfica 7) y representa el trabajo necesario para retirar el émbolo de la muestra (Friedman *et al.*, 1962).

En la Gráfica 7, se aprecia el comportamiento de la prueba de dos ciclos y se observó que la adhesividad para el producto 0% suero es significativamente diferente ($p < 0.05$) con respecto a los demás tratamientos (Tabla 11), siendo el tratamiento 0% con mayor adhesividad alcanzando valores de $-246.92 \pm 6.27 \text{ Kg} \cdot \text{mm/s}^2$, en comparación con los de mayor contenido de suero. Esta característica varía según el contenido de suero; a mayor presencia de suero disminuye la adhesividad.

La adhesividad de dulce de leche disponible en el mercado oscila entre $-121.99 - 199.21 \text{ Kg} \cdot \text{mm/s}^2$ (Ferreira *et al.*, 2012a; Ferreira *et al.*, 2012b). Los valores del tratamiento 0% suero está cercano a estos valores de la literatura, aunque en los tratamientos restantes (100%, 75% y 50%) la adhesividad es bastante baja. Esto también se podría atribuir a la hidrólisis de la lactosa. De acuerdo a lo reportado por Giménez *et al.* (2008) la hidrólisis causa una disminución significativa en la firmeza, adhesividad, y revestimiento en la boca.

El comportamiento de la adhesividad tiene una diferencia significativa ($p < 0.05$), con respecto al tiempo de almacenamiento, se puede observar en la Gráfica 9. La adhesividad del dulce de leche aumenta con el almacenamiento. Valencia y Millán (2009) encontraron comportamiento similar, en dulce de leche con carragenina bajo en calorías. Estos resultados lo relaciona a la sinéresis secundaria y al empleo de la goma que a su vez cambia el comportamiento viscoelástico, al ser sometida a procesos de agitación y elevadas temperaturas.



Gráfica 9. Comportamiento de la adhesividad de los cuatro tratamientos del dulce de leche con suero almacenado a 25 °C. Letras diferentes para un mismo tratamiento en cada días presentan diferencia significativa ($p < 0.05$).

4.3.5.3. Cohesividad

La cohesividad es la capacidad del producto de deformarse o de mantenerse unido en vez de romperse al masticar varias veces (Mielgaard *et al.*, 2006). Se mide como una relación de dos zonas (AII/AI) (Gráfica 7). El área bajo cada pico es la integral de la fuerza sobre la distancia, y por lo tanto representa el trabajo realizado en cada masticada. Este valor es una función directa del trabajo necesario para superar las ligaduras propias del material (Friedman *et al.*, 1962).

La cohesividad del dulce de leche, se ve influenciada por la cantidad de suero adicionado a cada tratamiento (Tabla 11); teniendo un comportamiento inversamente proporcional a la cantidad de suero. El producto más cohesivo es el que fue elaborado en su totalidad con leche con 0.84 y el de menos cohesividad es el 100% suero con 0.66. Entre estos dos tratamientos las

diferencias son estadísticamente significativas ($p < 0.05$). Los valores obtenidos coinciden con los encontrados por Ferreira *et al.*, (2012) en dulce de leche parcialmente sustituido por suero.

La cohesividad del dulce de leche comercial oscila en 0.58 – 0.59 (Ferreira *et al.*, 2012a; Ferreira *et al.*, 2012b), siendo estos valores inferiores a los encontrados en este estudio, sin embargo son cercanos a los del tratamiento 100% suero. Giménez *et al.* (2008) menciona que la hidrólisis de lactosa resultó en cambios complejos en el dulce de leche, cambiando significativamente todos los atributos evaluados de la apariencia, textura y sabor. La cohesividad no presenta diferencia significativa ($p > 0.05$) con respecto del tiempo (Apéndice 8.4).

Tabla. 11. Perfil de textura (TPA) de los cuatro tratamientos de dulce de leche a base de suero ácido

TRATAMIENTO	Dureza (Kg-mm/sec ²)	Adhesividad (Kg-mm/sec ²)	Cohesividad	Viscosidad Pa-s - 25°C
100	10.45 ^c ± 0.64	-5 ^a ± 5.34	0.66 ^b ± 0.04	14.75 ^c ± 2.20
75	10.80 ^c ± 0.64	-23.53 ^b ± 5.34	0.77 ^{ab} ± 0.04	13.98 ^c ± 2.20
50	17.96 ^b ± 0.64	-71.64 ^c ± 5.34	0.79 ^a ± 0.04	53.41 ^b ± 2.20
0	56.89 ^a ± 0.78	-246.92 ^d ± 6.27	0.84 ^a ± 0.04	71.21 ^a ± 2.69

Medias con la misma letra en la columna no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

4.3.5.4. Viscosidad

Las propiedades reológicas son importantes en diferentes aplicaciones en los alimentos, como control de calidad, almacenamiento, desarrollo de procesos y equipos, caracterización de materias primas y predicción de texturas de los alimentos (Hough *et al.*, 1991; Magerramov *et al.*, 2007; Rovedo *et al.*, 1991). En el dulce de leche las propiedades reológicas determinan la textura

del producto, lo que afecta la percepción sensorial y, en última instancia, la aceptación del producto por el consumidor (Konkel *et al.*, 2004; Demiate *et al.*, 2001; Garitta *et al.*, 2004).

Con respecto a la viscosidad del dulce de leche, ésta cambia con la concentración de suero y son diferentes estadísticamente ($p < 0.05$) entre tratamientos. Las muestras con mayor contenido de leche son las que tienen mayor viscosidad el tratamiento 0% suero tiene valores de 71.21 y 100% suero con 14.75. Esto se debe a que las muestras con mayor contenido de leche tendrán mayor concentración de sólidos totales Magerramov *et al.* (2007) observó en jugo que la viscosidad depende de la temperatura, presión, y concentración, que a mayor temperatura la viscosidad disminuye y a mayor concentración de sólidos la viscosidad aumenta. El dulce de leche presenta un comportamiento pseudoplástico, característico de un fluido no newtoniano. (Hough *et al.*, 1988; Pauleti *et al.*, 1990; Andrade *et al.*, 2009). Zimmermann, (2007) y Giménez *et al.* (2008) mencionan que la viscosidad disminuye como resultado de la hidrólisis de lactosa.

La vida útil del producto, así como la textura, consistencia y viscosidad están directamente relacionadas con el contenido de agua presente (Correia-Oliveira *et al.*, 2008). En la Tabla 7 se observa que las muestras de 100 y 75% tiene menor contenido de humedad y a su vez menor viscosidad.

4.4. Análisis sensorial

En la actualidad, el consumidor prefiere productos con altos estándares de calidad. Los productos con buenas características sensoriales (apariencia, aroma, sabor, textura y aceptación en general) son de gran importancia para ayudar a garantizar el liderazgo del producto en el

mercado (Watts *et al.*, 1992; Madrona *et al.*, 2009). El análisis sensorial es un campo muy importante en la industria alimentaria, que contribuye directa o indirectamente a numerosas actividades tales como el desarrollo de nuevos productos, control de calidad, relaciones entre las condiciones de proceso, ingredientes y aspectos sensoriales (Dias *et al.*, 2008). Donde los consumidores son la herramienta más adecuada para determinar los límites de tolerancia para los atributos sensoriales y defectos de un producto alimenticio (Giménez *et al.*, 2007).

A través de la evaluación sensorial fue posible, calificar las muestras de dulce de leche parcialmente sustituido por suero lácteo ácido, y evaluar la calidad y aceptabilidad de este producto. Para lo cual se realizó un análisis sensorial con 141 personas divididas en tres secciones diferentes. Los resultados estadísticos del análisis sensorial (Tabla 12) muestran que hay diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos, adquiriendo mayor puntaje el tratamiento con 75% suero seguido por el 0% suero, es similar al dulce de leche tradicional. Los tratamientos que tienen entre sí mayor diferencia en aceptabilidad son los tratamientos 100% y 75% suero.

Tabla. 12. Análisis sensorial dulce de leche, cuatro tratamientos.

Tratamiento	Suma(filas)	Media	n
100%	320.00	2.27 ^a	141
50%	352.00	2.50 ^{ab}	141
0%	362.00	2.57 ^{ab}	141
75%	376.00	2.67 ^b	141

Medias con la misma letra en la columna no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

En este estudio se observa que los panelistas prefirieron el segundo tratamiento con mayor contenido de suero (75%), sin embargo, en otros trabajos de dulce de leche parcialmente sustituido con suero lácteo, tienen más aceptabilidad las muestras con menor contenido de suero.

Dias *et al.* (2008) menciona al respecto que los tratamientos con mayor contenido de suero no son aconsejables porque el tiempo de preparación es mayor, adquieren menores ingresos y la consistencia es parecida a un jarabe dulce. Sin embargo, la adición de goma al producto hace posible elaborar dulce de leche con suero, con características similares al tradicional dulce de leche.

En un estudio similar donde el objetivo fue observar el efecto de la sustitución de suero en polvo y líquido sobre las características sensoriales del dulce de leche, los panelistas eligieron como mejor tratamiento al de 25% suero líquido. El 60% de ellos dijeron que comprarían el producto. Sin embargo se llegó a la conclusión de que la sustitución con 50% de suero polvo o líquido mostró un sabor menos empalagoso, mejor intención de compra, y consistencia más cerca a la puntuación ideal. En general, los autores observaron que el uso del suero líquido o en polvo no afecta la calidad sensorial del dulce de leche (Madrona *et al.*, 2009).

Ferreira *et al.* (2011), en un estudio sobre la aceptación del dulce de leche, con diferentes concentraciones de suero lácteo y almidón de maíz modificado, demostró que a mayor contenido de suero, independiente del porcentaje de almidón y el tiempo de almacenamiento, la apariencia, color y consistencia fueron mejores. Además aumentó la intención de compra e impresión general.

Días *et al.* (2008) realizó un análisis sensorial al dulce de leche parcialmente sustituido con suero lácteo, y obtuvo que las muestras con 20% de suero, obtuvieron mayor preferencia por parte de los panelistas. Aunque observaron resultados satisfactorios en sabor para la muestra con 40% de suero, recomienda la adición de glucosa y almidón para mejorar la consistencia de las muestras con mayor presencia de suero. En general, el uso de suero líquido no influye en las características físico-químicas y sensoriales del dulce de leche (Madron *et al.* 2009).

Es importante el evaluar el color y textura, ya que estos atributos cambian durante el almacenamiento y alcanzan niveles que los consumidores podrían considerar inaceptable (Garitta *et al.*, 2004).

En otra investigación de elaboración de dulce de leche con goma de Xantan y concentrado de proteína de suero dió como resultado productos con reducido contenido de sacarosa, en comparación con el dulce de leche tradicional y se observó que la adición de goma Xantan al dulce de leche, confirió viscosidad, y un doble efecto de permanencia de sabor en la boca, lo que contribuyó a la aceptabilidad del producto (Zimmermann *et al.*, 2007).

Este efecto se observó en esta investigación por lo que los panelistas dieron mayor puntuación a tratamiento con 75% suero.

4.5. Análisis dulce de leche con *Lactobacillus casei*

Con la realización del panel sensorial de los cuatro tratamientos (100%, 75%, 50% y 0%) de dulce de leche parcialmente sustituido por suero y leche parcialmente deslactosada, se determinó que el tratamiento con mayor preferencia de los panelistas fue el tratamiento 75% suero (Tabla 12). A esta tratamiento se le adicionó *Lactobacillus casei* como probiótico para

determinar cómo este influye sobre las características físico-químicas del dulce y cómo se comporta el microorganismo en este tipo de producto. El uso de probióticos en alimentos permite mejorar las características funcionales de los alimentos.

4.5.1. Análisis proximal de dulce de leche *Lactobacillus casei*

4.5.1.1. Humedad

El contenido de humedad del dulce de leche con respecto al tiempo presenta diferencia significativa ($P < 0.05$) (Tabla 13), entre el día 0 y día 80 (terminación de la vida útil del producto). La humedad disminuye para la muestra con probiótico. Sin embargo, Armisen y Galatas (2009) mencionan que el agar reduce la sinéresis de los geles e impide la pérdida de humedad durante el manejo, transporte y almacenamiento.

Tabla. 13. Análisis proximal del dulce de leche 75% suero, 25% leche con *Lactobacillus casei*. P = con probiótico, C = sin probiótico.

Tratamiento	Humedad%	Ceniza%	Grasa%	Proteína%	Carbohidratos%
P	21.1 ^a ±0.2	2.1 ^a ±0.2	7.2 ^a ±0.2	2.7 ^a ±0.2	67.0 ^b ±0.4
C	20.1 ^b ±0.2	2.0 ^a ±0.2	7.2 ^a ±0.2	2.6 ^a ±0.2	68.1 ^a ±0.4

Medias con la misma letra en la columna no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

El contenido de humedad para probiótico es de 21.1% y para la muestra control de 20.1% (Tabla 13) aunque es estadísticamente diferente, esta diferencia no es apreciable en el producto. Según Demiate et al. (2001) y Evangelista et al. (2010) la humedad del dulce de leche comercial oscila desde 19.0% y 37.2%, por lo que se observa que están dentro de este rango. Aldana (2009)

en la elaboración de dulce de leche con probióticos, obtiene una humedad aproximada de 25%, lo cual, teniendo en cuenta la Tabla 13, son valores cercanos a los encontrados en este estudio.

En términos generales, se observa que las muestras con probiótico no presentó cambios de humedad y que a su vez la humedad disminuye durante el tiempo de almacenamiento (80 días) (Tabla 14). El contenido de humedad inicial depende del tiempo de cocción y de la concentración de sólidos en el producto. Con respecto a los probióticos no se ha encontrado estudios que mencionen que la presencia de éstos en un producto causen disminución en la humedad.

Tabla. 14. Análisis proximal respecto al tiempo de almacenamiento del dulce de leche 75% suero, 25% leche con *Lactobacillus casei*. P = con probiótico, C = sin probiótico.

Tratamiento	Tiempo	Humedad%	Ceniza%	Grasa%	Proteína%	Carbohidratos%
P	0	22.4 ^a ± 0.3	2.3 ^a ± 0.2	7.2 ^a ± 0.3	2.7 ^a ± 0.3	65.4 ^c ± 0.5
C	0	20.3 ^b ± 0.3	2.3 ^a ± 0.2	7.4 ^a ± 0.3	2.8 ^a ± 0.3	67.2 ^b ± 0.5
P	80	19.7 ^b ± 0.3	1.8 ^b ± 0.2	7.2 ^a ± 0.3	2.6 ^a ± 0.3	68.6 ^a ± 0.5
C	80	20.0 ^b ± 0.3	1.7 ^b ± 0.2	6.9 ^a ± 0.3	2.4 ^a ± 0.3	68.9 ^a ± 0.5

Medias con la misma letra en la columna no son significativamente diferentes (p > 0.05)

4.5.1.2. Ceniza

El contenido de ceniza en base húmeda (Tabla 14) no es significativamente diferente (p>0.05) entre tratamientos. Además, el comportamiento con respecto al tiempo de almacenamiento (80 días), tampoco es significativo (Tabla 13). Aunque la tendencia de la ceniza en el producto es a disminuir para los dos tratamientos. Sin embargo se podría decir que la adición de probióticos al dulce de leche no altera el contenido de ceniza en el producto final y cumple con las normas establecidas de dulce de leche (Tabla 1), la cual no debe ser mayor del 2% en base húmeda.

4.5.1.3. Grasa

La presencia de grasa en el dulce de leche no se vio alterada por la presencia de probióticos. La estandarización la materia prima antes de la elaboración, garantizó un producto homogéneo, y se puede indicar que la presencia de probióticos no altera el contenido de grasa del producto ya que entre tratamiento y respecto al tiempo (Tablas 12 y 13) no hubo diferencia significativa ($p>0.05$).

4.5.1.4. Proteína

En la Tabla 7, se observó como la sustitución de leche por suero afecta en el contenido de proteína en el dulce de leche, donde el contenido de proteína aumenta a medida que aumenta la concentración de suero. Ahora se observa el comportamiento de la proteína del producto con respecto a la adición de probióticos al dulce de leche (Tabla 14). El contenido de proteína no presenta diferencia significativa ($p>0.05$) entre la muestra control y la muestra con probiótico. El tiempo de almacenamiento tampoco influye en el contenido de proteína del producto (Tabla 13 y 14), aunque los valores muestran una tendencia a disminuir, esto no es significativo. Resultados similares obtuvo Aldana (2009) en el trabajo de dulce de leche con probióticos. La presencia del probiótico (HOWARU Bifido LYO) y 6.4% de inulina hacen que la proteína presente en el dulce de leche disminuya. Sin embargo, la presencia de *Lactobacillus casei* 01 con 6.4% de inulina, no presenta cambios significativos, aunque la tendencia del contenido de proteína en el producto es a disminuir.

4.5.1.5. Carbohidratos

El contenido de carbohidratos influye directamente en el contenido de humedad (Zimmermann *et al.*, 2007; Andrade *et al.*, 2009; Pieretti *et al.* (2012). Se observa en la Tabla 14, que la muestra con probiótico es la que tiene mayor contenido de humedad y a su vez menor presencia de carbohidratos, el mismo comportamiento se observa con respecto al tiempo de almacenamiento, ya que pierden humedad y la presencia de carbohidratos aumenta, sin embargo no se encuentra diferencia significativa ($p>0.05$) (Tabla 14 y 13).

Aldana (2009) en la fabricación de dulce de leche con probióticos y fibra, la presencia de los probióticos HOWARU Bifido LYO y *Lactobacillus casei* 01, no afectan el contenido de carbohidratos. No obstante, la adición de fibra (inulina), provoca un aumento en el contenido de carbohidratos.

Teniendo en cuenta, el análisis de carbohidratos en base seca (Apéndice 9.4.3), se comportan de manera similar al no presentar diferencia significativa ($p>0.05$) entre tratamientos y con respecto al tiempo de almacenamiento.

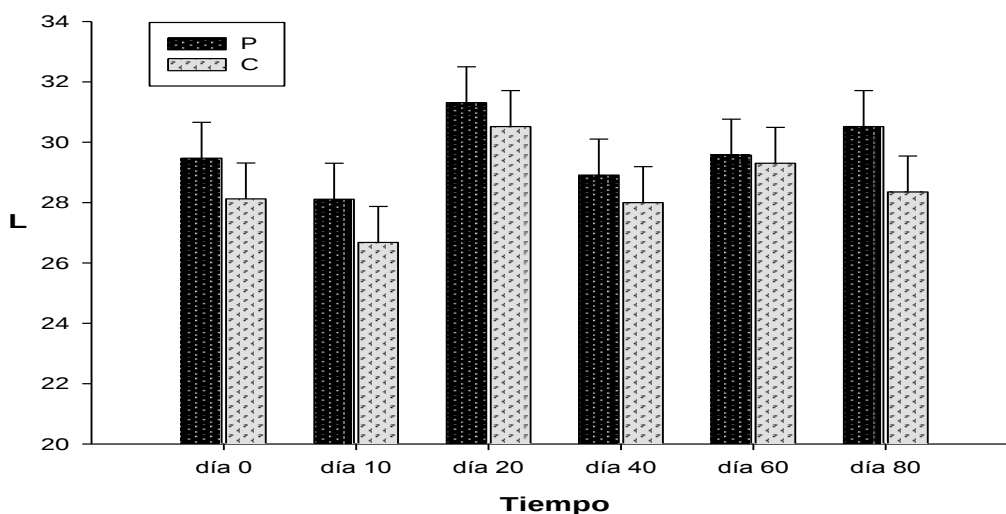
4.5.2. Análisis del perfil de color

4.5.2.1. Luminosidad (L)

El suero y leche utilizados para la elaboración del dulce pasaron por el proceso de hidrólisis de lactosa, ya que uno de los defectos más comunes de dulce de leche, es la presencia

de arenosidad, causada por la cristalización de la lactosa (Hough *et al.*, 1990; Martinez *et al.*, 1990). La hidrólisis de lactosa aumenta la velocidad de la reacción de Maillard resultado del incremento de azúcares reductoras (Perrone, 2006; Sabioni *et al.*, 1984) que a su vez causan un aumento significativo en la intensidad de color marrón y brillo (Giménez *et al.*, 2008).

Los valores de L (Tabla 15) para el dulce de leche con probióticos y la muestra control denotan un producto oscuro con valores de 29.65 y 28.5 respectivamente, (figura 4). Valores similares obtuvo Ferreira *et al.*, (2012b) en dulce de leche elaborado con suero. Además, se observa que estadísticamente no se encuentra diferencia significativa ($p>0.05$) entre tratamientos, sin embargo, esta diferencia no se detecta a simple vista, por lo que en la cotidianidad no se atribuye como diferencia.



Gráfica 10. Comportamiento del color (luminosidad L) en el tiempo de almacenamiento, en dulce de leche 75% suero, 25% leche con *Lactobacillus casei*. P = con probiótico, C = sin probiótico.

La interacción tratamiento – tiempo no presenta diferencias significativas ($p>0.05$) en el perfil de color para L (Gráfica 10). Aunque la tendencia en el producto es a tornarse más claro, el

día 20 tiene un marcado incremento para las dos muestras. Estos cambios a través del tiempo no fueron apreciados visualmente por lo que se dice que no afecta. Sin embargo en el análisis de los parámetros del color por Rodríguez *et al.*, (2012) con respecto a la luminosidad, se registró que mayor tiempo de exposición al tratamiento térmico los valores de L disminuyen, lo que significa menor luminosidad o mayor tendencia al negro en el producto almacenado.

Tabla. 14. Perfil del color de dulce de leche 75 % suero, 25% leche con *Lactobacillus casei*. P = 75% suero, y 25% leche con probiótico, C = 75% suero, y 25% leche sin probiótico.

TRATAMIENTO	L	Matiz (°H)	Saturación o Croma (C _{ab})
C	28.50 ^b ± 1	49.24 ^a ± 0.96	17.31 ^a ± 1.02
P	29.65 ^a ± 1	48.02 ^b ± 0.96	15.96 ^b ± 1.02

Medias con la misma letra en la columna no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

4.5.2.2. Matiz (°H) y Saturación (C_{ab})

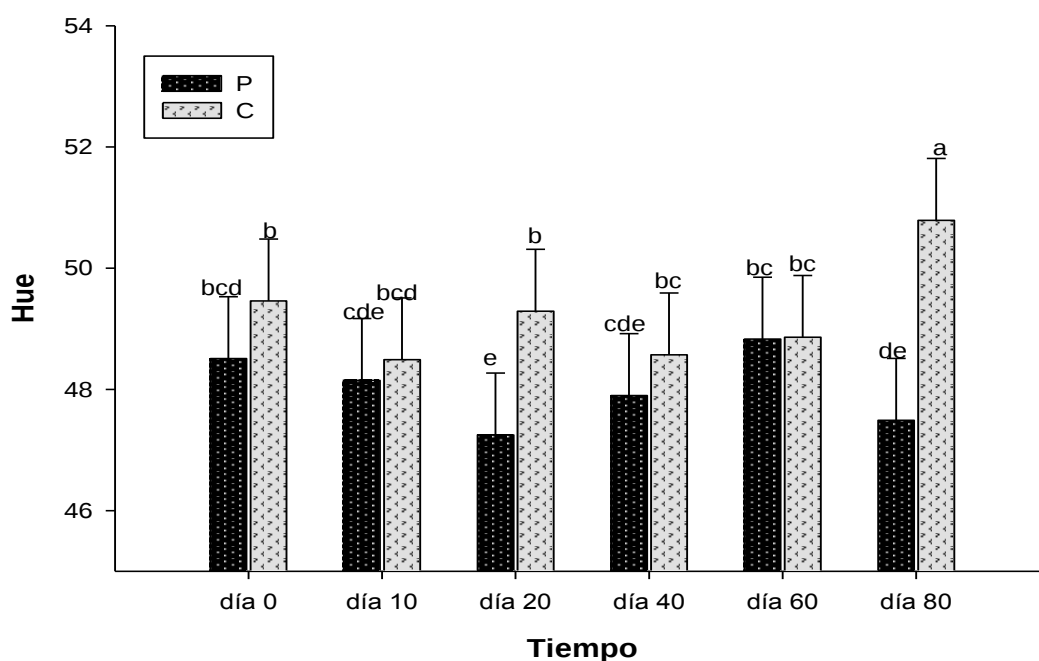
El matiz o tono del dulce de leche se encuentra entre 49.24 y 48.02 para control y probiótico respectivamente (Tabla 15). Estos valores están en los grados que corresponde a un color marrón (figura 4).

El color marrón es característico del dulce de leche, que es el resultado del desarrollo de los compuestos coloreados denominados melanoidinas que imparten un color marrón oscuro en las etapas finales de la reacción de Maillard. Esta reacción es afectada por varios factores, principalmente pH y temperatura (Martins, 2003; Rodríguez *et al.*, 2012).

Considerando que en las etapas avanzadas de la reacción de Maillard se forman las melanoidinas, pigmentos pardos de elevado peso molecular, la medida de color brinda un índice

útil para evaluar la intensidad de esta reacción (Rodríguez *et al.*, 2012). En la Tabla 16 se observa que el tratamiento control es el que alcanzó a concentrarse más y obtuvo mayor °Brix. Este tratamiento es el que presenta valores de L (28.5 ± 1) de un producto más oscuro y valores de croma (C_{ab}) (17.31 ± 1.02) de un producto menos saturado, por lo que se diría que se llevó la reacción de Maillard con mayor intensidad en este producto.

Matiz (°H), según el análisis estadístico poseen diferencia significativa ($p < 0.05$), durante el tiempo de almacenamiento entre tratamiento aunque esta diferencia no se percibió visualmente.



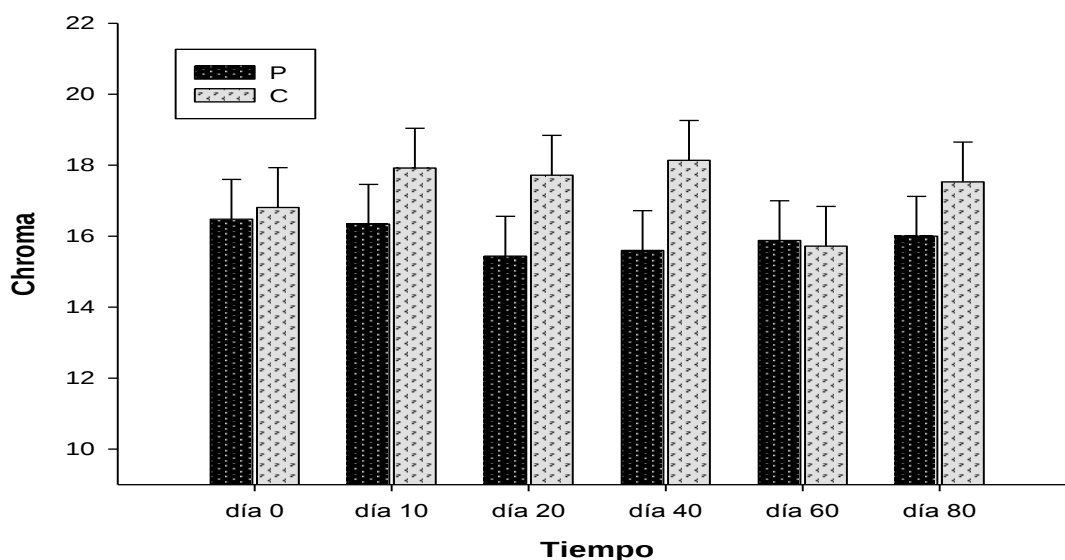
Gráfica 11. Comportamiento del color (Matiz (°H)) en el tiempo de almacenamiento, en dulce de leche 75% suero, 25% leche con *Lactobacillus casei*. P = con probiótico, C = sin probiótico. Letras diferentes para un mismo tratamiento en cada días, presentan diferencia significativa ($p < 0.05$).

Rodríguez *et al.* (2012), en un estudio de la evolución del desarrollo del color en sistema modelo de composición similar al dulce de leche, observó que la tendencia del color durante el

calentamiento fue hacia el aumento del componente rojo y del color marrón, y a la disminución de la luminosidad.

Durante el almacenamiento, las reacciones de Maillard continúan (Garitta *et al.*, 2004), ya que están expuestos a una temperatura y pH los cuales son unos agentes importantes para su desarrollo (Martins, 2003; Rodríguez *et al.*, 2012). Para esta investigación la temperatura de almacenamiento fue de 15 °C y el pH entre 5.83 y 6, aproximadamente, según el análisis estadístico no presentan diferencias significativa ($p > 0.05$) para croma (C_{ab}) con respecto al tiempo (Gráficas 12).

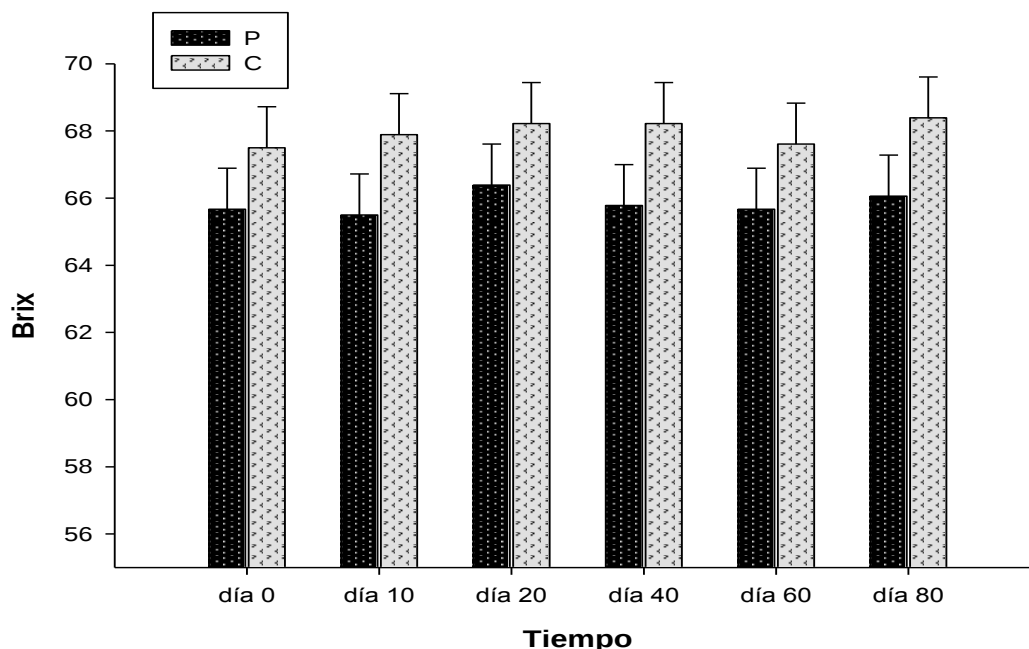
La tendencia por lo general para el matiz ($^{\circ}H$) comparando desde el día cero, es a disminuir, sin embargo, en el día 80 la muestra control aumenta. La diferencia para croma (C_{ab}) entre tratamiento es significativa aunque no perceptible y la tendencia en la muestra control es a aumentar y para la muestra con probiótico tiene a disminuir (Gráfica 12). Con respecto al color se diría que la presencia de *Lactobacillus casei* no afecta las propiedades del color ya que la diferencia entre el control y el tratamiento no son marcadas. En la Tabla 8 se observa las características de color de los cuatro tratamientos de dulce de leche sin probiótico y dichos valores están alrededor de estos.



Gráfica 12. Comportamiento del color para la Saturación o croma (C_{ab}) en el tiempo de almacenamiento, en dulce de leche 75% suero, 25% leche con *Lactobacillus casei*. P = con probiótico, C = sin probiótico.

4.5.3. °Brix

En los tratamientos utilizados como control y con probiótico, la materia prima (75% suero) y tiempo de cocción es similar por lo que se esperaría que tuviesen características iguales, sin embargo se observan ciertas diferencias significativa ($p < 0.05$) (Tabla 16). El tiempo en el cual se concentran los sólidos y el tiempo de enfriamiento en este producto, es primordial por lo que Giménez *et al.* (2008) menciona que el tiempo es como un ingrediente o sustituto que puede cambiar el efecto sensorial y a la vez ser un defecto. Además, como el dulce de leche es un producto altamente concentrado, cualquier variación en el contenido de humedad es significativa y en el momento de inocular el dulce, el probiótico está resuspendido en solución salina, lo que provocaría un cambio en el contenido de humedad y por consecuente en el contenido de °Brix.



Gráfica 13. Comportamiento °Brix en el tiempo de almacenamiento, en dulce de leche 75% suero, 25% leche con *Lactobacillus casei*. P = con probiótico, C = sin probiótico.

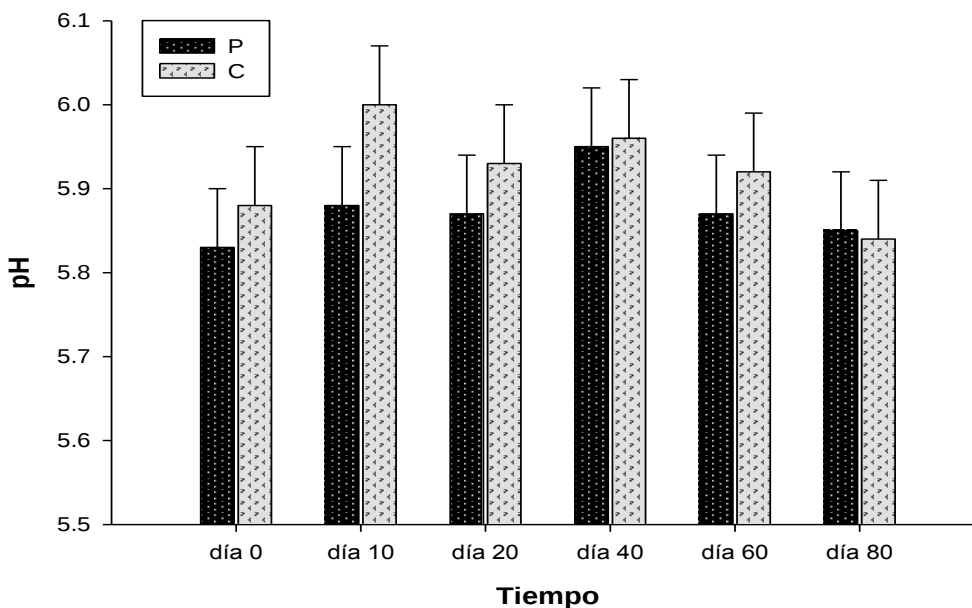
El comportamiento del °Brix durante el periodo de almacenamiento se pueden apreciar en la Gráfica 13, donde la interacción tratamiento – tiempo no presenta diferencia significativa ($p > 0.05$). Comportamiento similar obtuvo Valencia y Millán *et al.* (2009) al no encontrar diferencias significativas de los °Brix en el periodo de almacenamiento de dulce de leche bajo en calorías.

4.5.4. pH

El comportamiento del pH, según el análisis estadístico no es significativamente diferentes ($p > 0.05$) (Tabla 16) entre el tratamiento con probiótico y control. Además estos valores son prácticamente parecidos a los valores reportados en la tabla 10, donde el tratamiento 75% suero es igual al tratamientos con adición de *Lactobacillus casei*. Obando *et al.* (2010)

obtuvo comportamiento similar en un estudio para determinar la viabilidad de microorganismos probióticos (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus ácidophilus*, *Bifidobacterium* BB12) en queso cottage donde el producto inoculado con probióticos no tuvo cambios en el pH durante su almacenamiento.

La combinación de pH, tiempo y temperatura influyen en la velocidad de la reacción de Maillard la cual es relevante en el procesamiento de alimentos, teniendo de ese modo un alto impacto en la calidad de los alimentos (Martins, 2003). Rodríguez *et al.* (2012) observó que el pH y tiempo de almacenamiento influyen en los cambios del perfil de color como lo es en luminosidad y saturación (C_{ab}), por lo que el pH es muy importante controlar para no alterar las características físicas y químicas.



Gráfica 14. Comportamiento del pH en el tiempo de almacenamiento, en dulce de leche 75% suero, 25% leche con *Lactobacillus casei*. P = con probiótico, C = sin probiótico.

El comportamiento del pH durante el almacenamiento no reportó diferencias significativas ($p > 0.05$) aunque se puede apreciar en la Gráfica 14 que hasta el día 40 hay un

aumento progresivo de pH en los dos tratamientos (P y C) desciende después de este periodo, llegando a tener el mismo rango de valores de pH que el día cero y día 80. Comportamiento contrario obtuvo Valencia y Millán *et al.*, (2009) con respecto al pH al encontrar diferencias significativas en el periodo de almacenamiento de dulce de leche bajo en calorías.

Tabla. 15. Perfil químico del dulce de leche 75% suero, 25% leche con *Lactobacillus casei*. P = con probiótico, C = sin probiótico.

TRATAMIENTO	pH	Brix	A _w
C	5.92 ^a ± 0.06	67.97 ^a ± 1.18	0.75 ^b ± 0.01
P	5.88 ^a ± 0.06	65.84 ^b ± 1.18	0.77 ^a ± 0.01

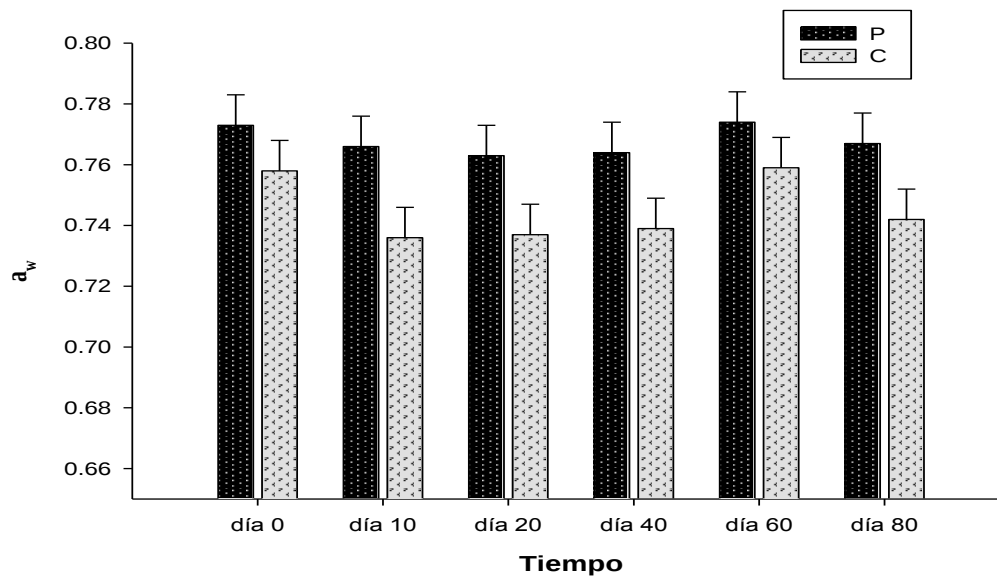
Medias con la misma letra en la columna no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

4.5.5. a_w

Lactobacillus casei, antes de ser adicionada al dulce de leche, se re suspende en solución salina. Esto podría explicar la diferencia significativa ($p < 0.05$) en el contenido de actividad de agua entre el tratamiento con probiótico y el control, en la Tabla 16 se observa que la muestra con probiótico tiene mayor actividad de agua ($P = 0.77$ y $C = 0.75$). Además se aprecia que el contenido a_w está relacionado con el contenido de sólidos solubles totales, ya que a mayor concentración de los solutos (mayor el °Brix) menor es la actividad de agua.

La actividad de agua (a_w), también influye en la velocidad de la reacción de Maillard junto a otros componentes como lo es pH y temperatura por lo que es un parámetro muy importante (Carabasa-Giribet *et al.*, 2000). La importancia del a_w resalta principalmente en que su valor indica cuan susceptible es un producto al ataque de microorganismos, ya que las levaduras y hongos pueden crecer en productos con actividad de agua entre 0.85 y 0.70, respectivamente (

Correia-Oliveira *et al.*, 2008), por lo que el mayor riesgo de ataque de microorganismos será por levaduras y hongos.



Gráfica 15. Comportamiento a_w en el tiempo de almacenamiento, en dulce de leche 75% suero, 25% leche con *Lactobacillus casei*. P = con probiótico, C = sin probiótico.

La interacción tratamiento y tiempo de almacenamiento (Gráfica 15), con respecto a la a_w no presenta diferencia significativa ($p > 0.05$).

4.5.6. Análisis del perfil de textura

4.5.6.1. Dureza.

Las muestras de dulce de leche con probióticos muestran tener mayor dureza que las muestras sin probiótico. Esta diferencia es significativa ($p < 0.05$) (Tabla 17). La dureza del dulce de leche se ve afectada desde un principio por la sustitución de suero por leche con valores de

12.1 y 9.51 Kg –mm/s² para la muestra con probiótico y control, respectivamente, sin embargo, la dureza del dulce de leche comercial está entre 66.70 – 206.46 (Ferreira *et al.*, 2012a; Ferreira *et al.*, 2012b), lo que significa que obtuvo un producto con menor dureza.

Valencia *et al.* (2008) en la elaboración de dulce de leche con sustitutos de azúcar observó que la dureza del dulce de leche tomo valores alrededor de 76,58 Kg-mm/sec², los cuales son similares a los valores de un dulce de leche comercial. Según, Armisen y Galatas (2009), el contenido de azúcar tiene un efecto considerable sobre el gel de agar-agar, pues su aumento resulta en un gel con mayor dureza pero con menor cohesión. Cabe resaltar que a las muestras elaboradas con suero lácteo en este trabajo se les adicionan goma agar - agar como agente espesante y gelificante para conseguir textura y aumentar la viscosidad, debido a que el suero posee baja concentración de sólidos.

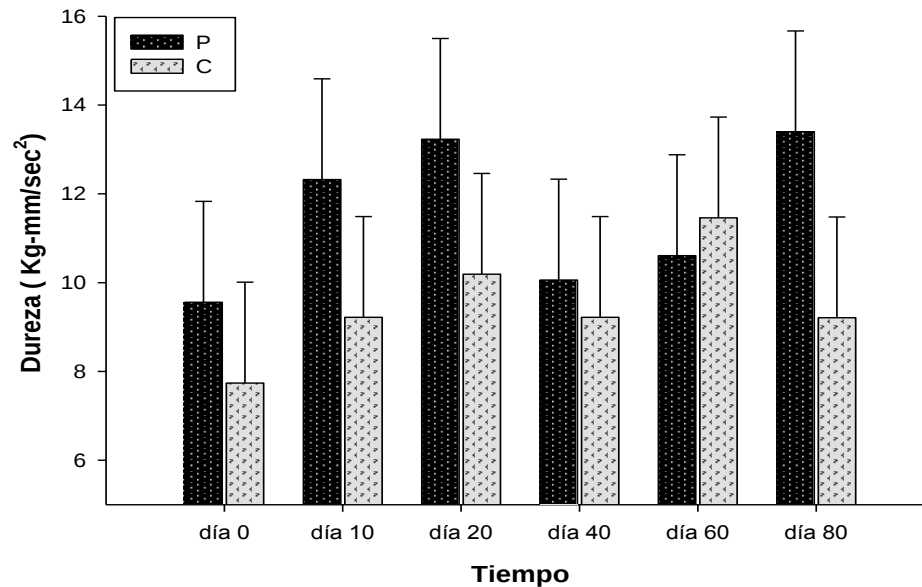
Tabla. 16. Perfil de textura del dulce de leche 75 % suero, 25% leche con *Lactobacillus casei*. P = con probiótico, C = sin probiótico.

TRATAMIENTO	Dureza	Adhesividad	Cohesividad
P	12.18 ^a ± 2.12	-25.97 ^b ± 9.69	0.69 ^a ± 0.01
C	9.51 ^b ± 2.12	-17.20 ^a ± 9.69	0.70 ^a ± 0.01

Medias con la misma letra en la columna no son significativamente diferentes (p > 0.05)

El comportamiento de la dureza con respecto del tiempo de almacenamiento, se puede observar en la Gráfica 16. El análisis estadístico, no presento diferencia significativa (p>0.05). Aunque se observa que la dureza en los dos tratamientos tiende aumentar en los días 10 y 20 y después disminuyen entre los días 40 y 60. Al final la muestra con probiótico es la que presenta mayor dureza con respecto al control. La muestra con probiótico es la que presento mayores

cambios durante el tiempo de almacenamiento, sin embargo esos cambios no son estadísticamente significativos (gráfica 16).



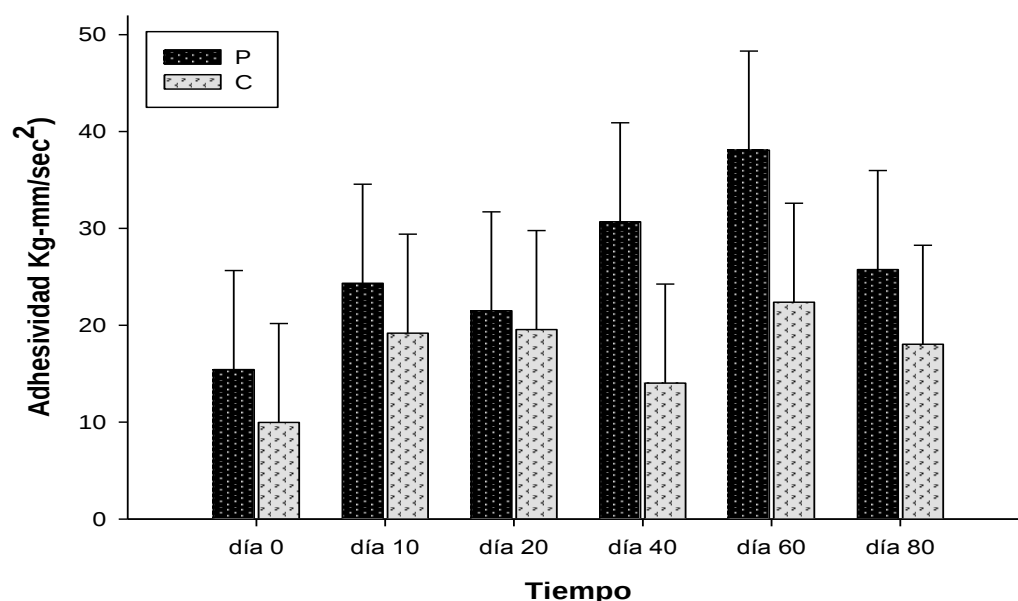
Gráfica 16. Comportamiento del perfil de textura (Dureza) en el tiempo de almacenamiento, en dulce de leche 75% suero, 25% leche con *Lactobacillus casei*. P = con probiótico, C = sin probiótico.

4.5.6.2. Adhesividad

La adhesividad del dulce de leche depende de la cantidad de proteínas presente en el producto (Tabla 11). Se estandarizó la grasa, azúcar y el resto de ingredientes, no obstante la diferencia está en el contenido de sólidos como lo es la proteína, que hace que la adhesividad aumente con respecto a la cantidad de leche presente en el producto. Comportamiento similar observa Ferreira *et al.* (2012a), al evaluar el dulce de leche comercial con diferentes ingredientes y composición. Observó que las muestras que fueron elaboradas con leche fresca y leche en polvo presentaron mayor adhesividad con valores entre -345.5 Kg-mm/sec² y -418.34 Kg-

mm/sec² que el resto de las muestras que no contenían leche en polvo independientemente de contener almidón, presentan menor adhesividad con valores entre -135.19 Kg-mm/sec² y -199.21 Kg-mm/sec². Además Bellarde (2006), obtuvo un comportamiento similar en dulce de leche sustituido parcialmente con concentrado proteico de suero, a mayor sustitución de proteína de suero aumenta la adhesividad.

La adhesividad del producto con probióticos y control es significativamente diferente ($p < 0.05$), entre sí, aunque contienen la misma cantidad de suero y leche (Tabla 17). Sin embargo al tratamiento control como no se le adicionó probióticos no se ve expuesto a la solución salina, la cual podría ser una causa de la diferencia en adhesividad entre los dos tratamientos. La interacción del tiempo con la adhesividad no presenta diferencia significativa ($p > 0.05$), (Gráfica 17). En los días 40 y 60 hay un aumento de la adhesividad para la muestra con probióticos, este comportamiento es inverso al de dureza donde ocurre una disminución de dureza y un aumento en adhesividad (Gráfica 16).

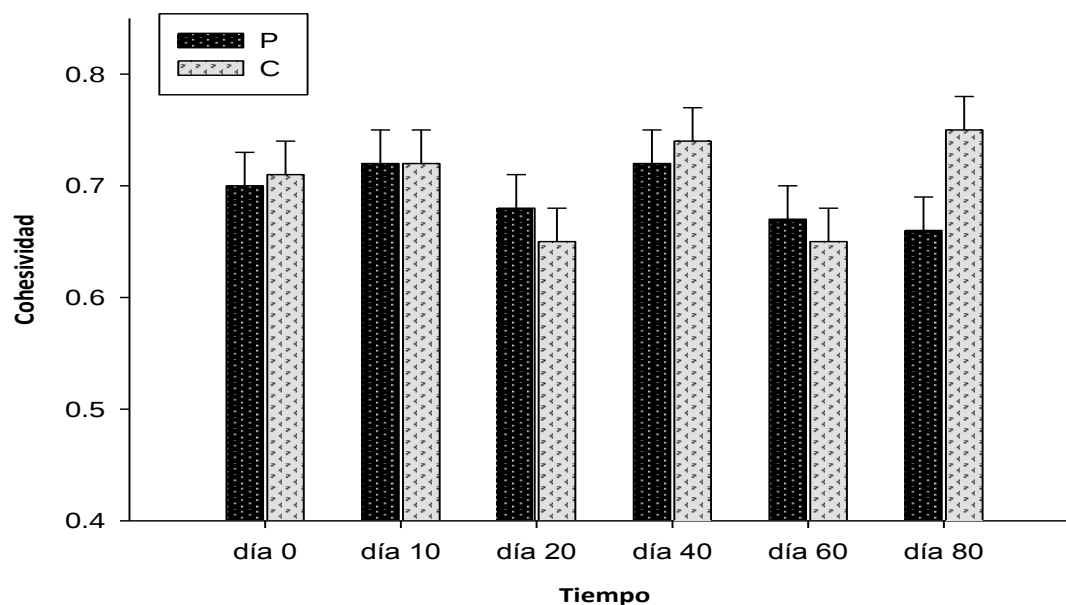


Gráfica 17. Comportamiento del perfil de textura (Adhesividad) en el tiempo de almacenamiento, en dulce de leche 75% suero, 25% leche con *Lactobacillus casei*. P = con probiótico, C = sin probiótico

4.5.6.3. Cohesividad

El dulce de leche tradicional es un producto bastante cohesivo. Se puede observar que la sustitución de suero en los tratamientos no influyó en la cohesividad del producto ya que no presenta diferencia significativa ($p>0.05$) entre tratamientos (Tabla 17). Los valores obtenidos ($P = 0.69$ y $C = 0.70$) coinciden con los encontrados en otros trabajos. Ferreira *et al.* (2012) en estudio de dulce de leche sustituido parcialmente con suero y extracto de soya, los valores de cohesividad oscilaron entre 0.65 y 0.72. Además se puede decir que la adición de probiótico no altera esta característica de textura en dulce de leche pues en la Tabla 11, los tratamientos parcialmente sustituidos con suero poseen valores iguales en cohesividad.

Estadísticamente la interacción de la cohesividad con respecto al tiempo no presenta diferencia significativa ($p>0.05$) (Gráfica 18).



Gráfica 18. Comportamiento del perfil de textura (Cohesividad) en el tiempo de almacenamiento, en dulce de leche 75% suero, 25% leche con *Lactobacillus casei*. P = con probiótico, C = sin probiótico.

4.5.6.4. Viscosidad

Existe poca información en la literatura sobre el comportamiento reológico del dulce de leche comercial. La mayoría de los estudios se han llevado a cabo con leche evaporada con y sin azúcar y el contenido total de sólidos es menor del 30% (Rovedo *et al.*, 1991). Sin embargo, Hough *et al.* (1988) ha observado que las propiedades de flujo de dulce de leche son muy diferentes a la leche evaporada. Dichas diferencias se deben a la concentración total de sólidos, que varían desde 54% hasta 70%.

En este estudio se puede observar claramente lo mencionado por Magerramov *et al.* (2007) y Rovedo *et al.* (1991), la viscosidad depende de la temperatura, presión y concentración, y que a mayor temperatura disminuye la viscosidad y viceversa. Los valores de viscosidad del dulce de leche con probióticos fueron tomados a 15 °C y se observó que el dulce de leche conserva mejor sus características físicas (Tabla 18) ya que a menor temperatura de almacenamiento, la cantidad de cristales fue mayor, debido a una mayor sobresaturación. Sin embargo a temperaturas bajas los cristales son más pequeños debido a la disminución de la movilidad molecular y a temperaturas altas, el número de cristales es menor pero con un mayor tamaño de cristal (Ares and Gimenez, 2008). Los tratamientos de 75% suero al cual se le adicionó probiótico a temperatura de 15 °C la viscosidad fue de 35.42 – 26.62 y a una temperatura de 25°C fue de 13.98 (Tabla 11) y se observó que a menor temperatura la viscosidad aumenta y los cristales son más pequeños.

Además se observa que durante el tiempo de almacenamiento la viscosidad incrementa (Tabla 18), Rovedo *et al.* (1991), también observó un aumento en la viscosidad aparente con el

tiempo de almacenamiento, el cual podría ser debido a que se requiere un cierto tiempo para que las proteínas de dulce de leche puedan llegar a una configuración de equilibrio.

La viscosidad aparente del dulce de leche se ve afectada por la temperatura y el pH de la muestra pH bajo (pH=3) reduce y pH alcalino (pH=8.3) incrementa la viscosidad aparente con respecto a la muestra estándar (pH=6.1). La viscosidad aparente aumenta con el tiempo de almacenamiento independientemente del pH (Rovedo *et al.*, 1991). En este estudio no se observó cambios significativos de pH en el tiempo (Gráfica 13), por lo que el aumento en viscosidad no se podría atribuir al cambio de pH. Este cambio se le podría atribuir a la sobresaturación de la lactosa, ya que esto provoca la presencia de arenosidad en el producto y a su vez presenta mayor resistencia a fluir.

En cuanto a la viscosidad también se observó que ésta cambia en dependencia de la temperatura de almacenamiento. Si se mantiene en condiciones de refrigeración los cambios no son perceptibles. La primera fase de los cuatro tratamientos se realizó a 25 °C y la percepción de la anerosidad fue más acelerada, la vida útil del producto es 30 días y a 15°C permaneció por 80. Por lo tanto, la influencia de la temperatura sobre el crecimiento de cristales depende de la viscosidad y la sobresaturación en diferentes grados. Las temperaturas de almacenamiento más bajas resultaron en tasas de crecimiento de los cristales más pequeños, lo que sugiere una inhibición de la tasa de crecimiento, probablemente debido a un aumento de la viscosidad y por consiguiente, menor movilidad molecular. En estudios anteriores, con respecto a las temperaturas de almacenamiento se encontró que a 25°C permite un tiempo de almacenamiento del producto de 109 días sin afectar las características sensoriales evaluadas. A medida que aumenta la

temperatura el tiempo de vida útil del producto se ve reducido (37°C, 53 días - 45°C, 9 días) (Garitta *et al.*, 2004).

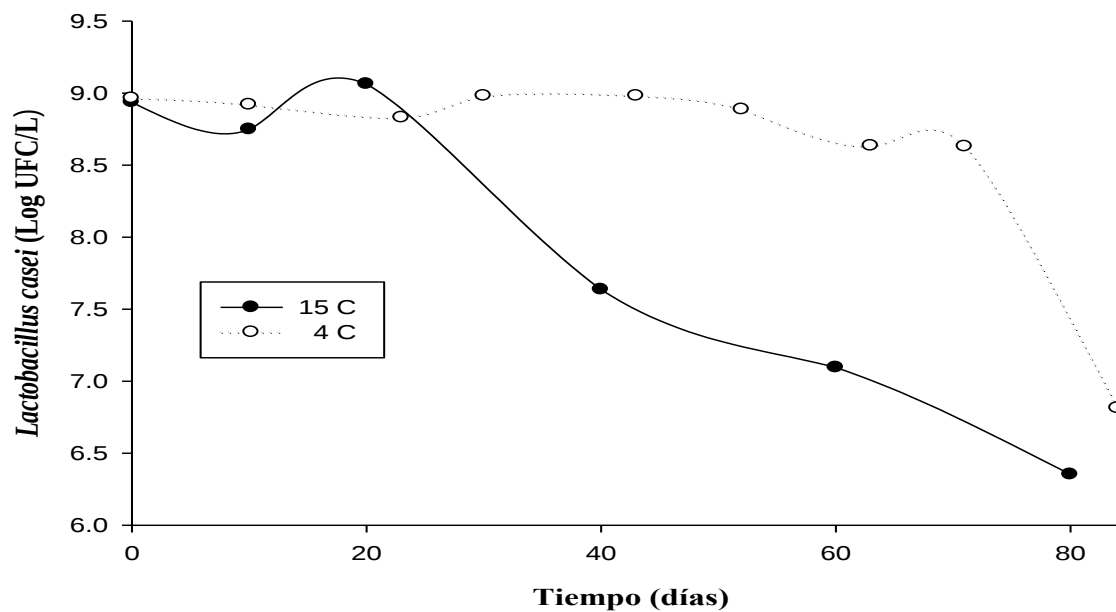
Tabla. 17. Viscosidad del dulce de leche 75% suero, 25% leche con *Lactobacillus casei*. P = con probiótico, C = sin probiótico.

Tiempo (días)	Tratamiento	Viscosidad Pa – s (T = 15°C)
0	P	26.62 ^b
	C	35.42 ^b
80	P	51098.48 ^a
	C	66348.88 ^a

Medias con la misma letra en la columna no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

4.6. Análisis microbiológico en dulce de leche

4.6.1. Análisis sobrevivencia *Lactobacillus casei*



Gráfica 19. Comportamiento de *Lactobacillus casei* en dulce de leche 75% suero, 25% leche en el tiempo de almacenamiento a diferentes temperaturas 15°C y 4°C.

El comportamiento de *Lactobacillus casei* en dulce de leche almacenado a 15 °C, hasta el día 20, es igual al almacenado a 4 °C obteniendo recuentos de 10^8 a 10^9 UFC/g. Pasado este período la sobrevivencia de la bacteria almacenado a 15 °C disminuye proporcionalmente con el tiempo, tanto que desde el día 20 al día 40 disminuyen en aproximadamente dos ciclos logarítmicos, y para el día 80 de almacenamiento alcanzan recuentos de 10^6 UFC/g.

En el caso del dulce de leche almacenado a 4 °C *Lactobacillus casei* mantiene su viabilidad constante durante los 72 días con recuentos desde 10^8 a 10^7 UFC/g. Pasado este tiempo presenta una disminución abrupta al día 80 (Gráfica 19) alcanzando recuentos de 10^6 UFC/g. Según Pereira et al. (2011), el crecimiento y la viabilidad de *Lactobacillus casei*, depende mayormente de la temperatura de crecimiento que del pH. Obando et al., (2010) observó en queso cottage que *Lactobacillus casei* pierde mayor viabilidad al comienzo del almacenamiento (1 ciclo logarítmico), debido a las condiciones de acidez y temperatura de refrigeración (4 °C), no obstante durante toda la vida útil del producto registra niveles altos de recuento microbiano, estableciendo una diferencia significativa con los otros tratamientos (*Bifidobacterium* BB12 y *Lactobacillus acidophilus* La-5). Aldana (2009) emplea *Lactobacillus casei* 01 y HOWARU Bífido LYO con prebiótico (inulina) en dulces de leche almacenados a 4 °C los cuales sobrevivieron 30 días con recuentos de 10^7 UFC/g (día cero) a 10^5 UFC/g (día 30). Sin embargo, HOWARU Bífido LYO se mantuvo constante durante ese periodo con recuentos de 10^6 UFC/g (día cero y 30) en presencia de inulina al 3.2%.

Obando et al. (2010) destaca la importancia de lograr un alto recuento de microorganismos probióticos el día cero puesto que no observo desarrollo de organismos en este

período y la población decreció, por el contrario Aldana (2009) sugiere que una cantidad mayor de cultivos lácticos no ayudan a aumentar las UFC/mL en el dulce de leche, porque se obtienen valores menores al valor de referencia debido a la competencia que existe entre los microorganismos por el prebiótico (fibra) y el agua.

Lactobacillus casei mantuvo mayor viabilidad a temperatura más baja a 4 °C. A 15 °C presenta más cambios durante el tiempo de almacenamiento. Por lo que es preferible almacenar a 4 °C porque a esta temperatura se tiene una población de probióticos constante y mayor vida útil del producto. Con respecto a la vida útil del producto, las características físicas y sensoriales se mantienen mejor a temperaturas de 4 °C y 15 °C, ya que el defecto de arenosidad se retarda y se puede consumir un producto de excelente calidad hasta los 60 días de almacenamiento, ya que el crecimiento de los cristales aumenta proporcionalmente con el tiempo de almacenamiento, y la presencia de arenosidad en un factor de rechazo del producto. Además a los 60 días de almacenamiento la presencia del probiótico alcanza recuento de 10^8 UFC/g.

La deseabilidad de almacenar productos con probióticos refrigerados, también la observó Pereira *et al.* (2011) quien investigó la capacidad de supervivencia de *Lactobacillus casei* en el jugo de manzana refrigerado (4°C) durante 42 días. Observó que la *Lactobacillus casei* creció durante el almacenamiento refrigerado, y con recuento de células viables superiores a 8 log UFC/mL durante todo el período de almacenamiento.

Jaworska *et al.* (2011) estudio la supervivencia de dos cepas probióticas en lomo de cerdo, *Lactobacillus acidophilus* Bauer y *Lactobacillus casei* Bif3/ IV. Obtuvo recuentos más

alto con *Lactobacillus casei* Bif3/IV durante 6 meses de almacenamiento a 4 ± 1 °C, manteniéndose a nivel 10^6 UFC/g.

4.6.2. Recuento de hongos, levaduras y coliformes

En general, los productos con alto contenido de azúcar tienen baja A_w y en consecuencia son microbiológicamente estables (Armisen y Galatas, 2009). Debido a las condiciones y composición del dulce de leche (baja actividad de agua y altas concentración de azúcar), el mayor riesgo de contaminación lo constituyen los mohos y levaduras, que son capaces de desarrollarse en condiciones de bajas actividad de agua (Andrade *et al.*, 2009). El dulce de leche elaborado a base de suero y con probióticos (*Lactobacillus casei*), no presentó crecimiento de mohos y levaduras durante el tiempo de almacenamiento (80 días a 15°C) (Tabla 19). Las colonias desarrolladas en el producto, fueron a diluciones bajas (10^1) y el conteo no fue significativo (<10 colonias) para considerar su presencia. Aunque este producto está elaborado con goma agar – agar, que es un medio fértil para el crecimiento de bacterias y hongos, no hubo recuento debido a que se mantuvo siempre buen manejo higiénico. La ausencia de hongos y levaduras proporcionan información sobre las condiciones sanitarias del procesamiento, almacenamiento y transporte de los alimentos, y constituyen indicadores importantes del deterioro de los alimentos (Timm *et al.*, 2007).

Erdogrul y Erbilir (2006) demostraron que *Lactobacillus casei*, tiene resistencia a antibióticos como ampicilina, vancomicina, oxacilina, cefalotina, cefodizima y tobramicina. Además posee actividad bacteriana frente a cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, y

Enterobacter cloacae. El efecto antimicrobiano ejercido por las bacterias lácticas, es debido a la producción de ácido láctico, reducción de pH, presencia de ácido acético, diacetilo, peróxido de hidrógeno, ácidos grasos, aldehídos y de otros compuestos.

Aunque el dulce de leche no es un producto propicio para el crecimiento de microorganismos por su alta concentración de carbohidratos y en consecuencia, baja actividad de agua, no se excluye la posibilidad de transmisión de bacterias patógenas. La presencia de microorganismos como *Salmonella*, *Staphylococcus*, *coliformes*, en dulce de leche ha sido motivo de preocupación de los organismos responsables de inspección de los alimentos y salud pública, por esta razón se han establecido límites de tolerancia para la presencia de estos microorganismos (Hentges *et al.*, 2008; Timm *et al.*, 2007).

En esta investigación no se encontró presencia de coliformes en ninguna de las etapas de almacenamiento. Timm *et al.* (2007) en un análisis microbiológico a 28 muestras de dulce de leche comercial, todas las muestras tuvieron recuentos de coliformes fecales <3 NMP/g, excepto en dos muestras, además hubo presencia hongos y levaduras con $6,0 \times 10^4$ a $1,4 \times 10^1$ UFC/g, respectivamente, solo una muestra obtuvo recuentos de mohos y levaduras aceptable para los estándares brasileños.

La temperatura elevada durante el periodo de fabricación y las buenas prácticas de manufactura hasta el envasado impiden presencia de microorganismos patógenos (Sousa *et al.*, 2002).

Aunque la temperatura de almacenamiento inhibe el crecimiento de microorganismos que afectan la estabilidad y la vida útil de los alimentos, *Staphylococcus aureus* es uno de los

microorganismos que se puede contrarrestar manejando temperatura por debajo de 6,0°C, además teniendo en cuenta parámetros de crecimiento como Aw: 1.00–0.86 y pH: 4.0–9.3. (Kilcast y Subramaniam, 2000).

Los resultados obtenidos por Hentges et al., (2010) mostraron que *E. coli* O157: H7, sobrevive hasta 30 días en dulce de leche, lo que hace de este producto un potencial portador de microorganismos. Teniendo en cuenta la gravedad de algunos casos clínicos causados por *E. coli* O157: H7 y la dosis infectiva muy baja a los grupos vulnerables de 10 a 100 células bacterianas o incluso menos, los resultados son una advertencia sobre la necesidad de tomar las medidas higiénico-sanitarias necesarias durante la fabricación de dulce de leche, embalaje y manipulación.

Presencia de *Salmonella* y *E. coli* O157: H7, en alimentos es inaceptable o alimentos con una concentración superiores a 100 UFC/g de *Listeria monocytogenes* es considerado de alto riesgo. Sin embargo la capacidad de sobrevivencia de *L. monocytogenes* en el dulce de leche hasta 30 días es suficiente para considerar este alimento un potencial portador de esta bacteria a los humanos (Hentges et al., 2010).

Sousa et al. (2002) analizaron el dulce de leche producido con leche de búfala en la isla de Marajó, Brasil, no detectó presencia de *Salmonella* y *Staphylococcus aureus* y los resultados obtenidos de bacterias mesófilas, mohos y levaduras demostró las buenas condiciones sanitarias.

El análisis microbiológico realizado por Silva et al. (2011) para determinar presencia de *Coliformes*, *Staphylococcus spp*, levaduras y mohos en dulces de leche comercial. Demostró que todas las muestras de dulce de leche cumplen con los estándares establecidos por la ley; al no encontrar presencia de microorganismos. Resultado similar obtuvo Pieretti et al. (2012).

Tabla. 18. Análisis microbiológico de hongos, levaduras, mesófilos y coliformes en dulce de leche con suero 75% y 25% leche con *Lactobacillus casei*. P = con probiótico, C = sin probiótico.

Análisis	Tratamiento	Resultados	Valores de referencia
Recuento de mohos y levaduras, UFC/g	P	<10 UFC/mL	10 - 100
	C		
Recuento de coliformes, UFC/g	P	<10 UFC/mL	10 - 100
	C		
Recuento de bacterias mesofílicas, UFC/g	P	<10 UFC/mL	10 - 100
	C		

6. CONCLUSIONES

Se elaboró dulce de leche con suero ácido 40% deslactosado, en tres proporciones diferentes 100%, 75%, 50% y 0% suero. Los tratamientos con mayor proporción de suero, presentan menor contenido de humedad y proteína y son productos menos adhesivos (-5 a -246.92 para 100% y 0% suero respectivamente), menos duros (10.45 a 56.89 para 100 y 0% suero respectivamente) y menos viscosos (14.75 a 71.21 para 100% y 0% suero respectivamente). A mayor contenido de suero se añadió mayor cantidad de goma agar, esto provocó un aumento en el contenido de ceniza por encima de los estándares establecidos en la normatividad que lo rige. Se obtuvo un producto de coloración marrón más oscura (L=26.98 para 100% y L= 34.26 para 0% suero) por la hidrólisis de lactosa que potencializa la reacción de Maillard. El contenido de suero en el producto no afecta la actividad de agua ni el valor de pH. El tiempo de almacenamiento, provoca un aumento de la adhesividad y dureza en el tratamiento 0% suero.

Los consumidores en la prueba sensorial eligieron la muestra 75% suero como de mayor preferencia en términos generales con una puntuación de 376. La mayoría de panelistas perciben la presencia de arenosidad en las muestras analizadas.

La presencia de *Lactobacillus casei* no afectó a las características fisicoquímicas como proteína, grasa, humedad, ceniza, viscosidad, pH y color (L, Matiz, Saturación) entre los tratamientos. La viscosidad y arenosidad están relacionados con la temperatura de almacenamiento. A 25 °C la vida útil es de 30 días, sin embargo a temperaturas menores como 15 °C la vida útil es 80 días.

Lactobacillus casei, se adaptó y sobrevive con facilidad durante todo el tiempo de almacenamiento (80 días) a 15 °C y 4 °C con recuentos de 10^8 a 10^9 UFC/g respectivamente en el día cero y 10^6 UFC/g al día 80. La evaluación de la viabilidad de los cultivos probióticos demuestra que es posible adicionar este tipo de microorganismos al dulce de leche con una vida útil de 80 días, cumpliendo con el requisito (10^6 UFC/g). Por lo que se catalogaría como un producto funcional, capaz de ejercer propiedades terapéuticas. La temperatura de 4 °C, es la más recomendada por que alcanza mayor recuento y valores constantes de UFC durante el almacenamiento. Además, durante el tiempo de almacenamiento no se observó recuento de mohos (<10 UFC/g), levaduras (<10 UFC/g) y coliformes (<10 UFC/g), por lo que se considera que el dulce de leche es un alimento estable al ataque de microorganismos deterioradores de calidad, ya que el contenido de actividad de agua (a_w) está alrededor de 0.78 ± 0.3 , cabe resaltar la importancia de tener buenas prácticas sanitarias e higiénicas.

Bajo las condiciones de este estudio es posible elaborar dulce de leche con una sustitución de hasta 75% de suero, por lo que este producto se presenta como una posible alternativa para reducir el problema de disposición de suero ácido y pese a que el dulce de leche tiene un bajo a_w , se observó el crecimiento de *Lactobacillus casei*, permitiendo elaborar un producto funcional con probióticos.

7. RECOMENDACIONES

Elaborar dulce de leche con diferentes porcentajes de hidrólisis para determinar su porcentaje óptimo con suero ácido.

Evaluar sensorialmente el dulce de leche con suero ácido teniendo en cuenta la interacción sabor y textura, empleando diferentes tipos de goma.

Determinar el efecto de *Lactobacillus casei*, en la disminución de arenosidad (tamaño y cantidad de cristales).

Determinar la sobrevivencia o presencia de *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* y *E. coli* O157: H7, en dulce de leche con suero ácido y con probióticos

8. BIBLIOGRAFÍA

- Agência Nacional de Vigilância Sanitária Brasil. Gerência-Geral Alimentos. Resolução - CNNPA nº 12, de 1978. <http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/home>. Consultado el 9/03/2013.
- Andrade, P. R., IVélez, H. G., Arteaga, M. M., Díaz, Q. Y., & Sánchez, S. S. S. (2009). Neutralization and addition of sweetening effect in de edulcorante en las propiedades fisicoquímicas , microbiológicas y sensoriales. *Vitae*, 16(2), 201 – 209.
- Aldana, G. L. A. (2009). Desarrollo arequipe con fibra y cultivos probióticos. Tesis M.S. Universidad Nacional de Colombia, Bogota, Colombia, 63pp.
- Almeida, K. E. Bonassi, I. A and Roça, R.O. (2001). Características físico y químicas de bebidas lácteas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 2(2), 187-192.
- AOAC. 1998. Official Methods of Analysis Association of Official Analytical Chemistry. Washington D.C., USA.
- Ares, G., & Gimenez, A. (2008). Influence of temperature on accelerated lactose crystallization in dulce de leche. *International Journal of Dairy Technology*, 61(3), 277–283.
- Armisen. R, & Galatas. F. (2009). Handbook of hydrocolloids. (Phillips. G. O.& Williams. P. A. Eds.), second Edi. CRC Press, Boca Raton, Boston New York., 1003 pp.
- Ashraf, R., & Shah, N. P. (2011). International Journal of Food Microbiology Selective and differential enumerations of *Lactobacillus delbrueckii subsp . bulgaricus* , *Streptococcus thermophilus* , *Lactobacillus acidophilus* , *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium spp* . in yoghurt — A review. *International Journal of Food Microbiology*, 149(3), 194–208.
- Banavara, D. S. Anupama, D. and Rankin, S. A. (2003). Studies on physicochemical and functional properties of commercial sweet whey powders. *J. Dairy Sci.* 86: 3866 – 3875.
- Banerjee, S., & Bhattacharya, S. (2011). Compressive textural attributes, opacity and syneresis of gels prepared from gellan, agar and their mixtures. *Journal of Food Engineering*, 102(3), 287–292.
- Bellarde, F. B. (2006). Elaboração de doce de leite pastoso com substituição parcial dos sólidos de leite por concentrado protéico de soro. *Revista Uniara*, 17(18), 249 – 256.
- Blaschek, K. M. Wendorff, W. L. and Rankin, S. A. (2007). Survey of Salty and Sweet Whey Composition from Various Cheese Plants in Wisconsin. *J. Dairy Sci.* 90: 2029–2034.
- Broadbent, J. R., Neeno-Eckwall, E. C., Stahl, B., Tandee, K., Cai, H., Morovic, W., Horvath, P., et al. (2012). Analysis of the *Lactobacillus casei* supragenome and its influence in species evolution and lifestyle adaptation. *BMC genomics*, 13, 533.

- Carabasa-Giribet, M., & Ibarz-Ribas, a. (2000). Kinetics of colour development in aqueous glucose systems at high temperatures. *Journal of Food Engineering*, 44(3), 181–189.
- Champagne, C. P. Gardner, N.J and Roy, D. (2005). Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. *Food Science and Nutrition*. 45(1), 61–84.
- Champagne, C.P., Roy, D., Lafond, A. (1997). Selective enumeration of *Lactobacillus casei* in yoghurt-type fermented milks based on a 15 °C incubation temperature. *Biotechnology Techniques* 11, 567–569.
- Código Alimentario Argentino. (2010). Administración nacional de medicamentos, alimentos y tecnología médica, secretaria de políticas, regulación y relaciones sanitarias, ministerio de salud, republica Argentina.http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/capitulo_VIII.pdf. Consultado el 25/09/2012.
- Coelho, E.B.B. (1980). Utilizacao da beta-D-galactosidase no controle da cristalizacao do doce de leite. Tesis M.S. Universidade Federal de Viçosa , Vicoso, Brazil.69 pp.
- Corrales. A, Henderson. M y Morales. I. (2007). Sobrevivencia de microorganismos probióticos en helado batido *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium lactis* en helado batido. *Rev. Chil. Nutr*, 34(2): 157-163.
- Correia-Oliveira., M. E., Ferreira., A. F., Poderoso., J. C. M., Lessa., A. C. V., Araujo., E. D., Gutierrez., M. A., & Ribeiro, T. G. (2008). Atividade de Água (Aw) em Amostras de Pólen Apícola Desidratado e Mel do Estado de Sergipe. *Revista da Fapese*, 4(2), 27–36.
- Curry. B and Crow. V. (2002). *Lactobacillus casei* Group. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Ed. Elsevier Science Ltd. Palmerston North, New Zealand, 1488–1494 pp.
- Demiate, I. M., Konkel, F. E., & Pedroso, R. A. (2001). Enzymatic Determination of Starch in doce de leite using dialysis, 21(3), 339–342.
- Dias, C. D. A., Corrente, L. A., & Dias, C. D. A. (2008). Análise sensorial de doce de leite produzido com adição de soro de leite. *Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR*, 2(17), 33.
- Doyle. M. P, Klaenhammer. T. R. (2000). *Annual review of food science and technology*. Vol 1. Palo alto, California USA. 519 pp.
- Erdogrul, Ö., & Erbilir, F. (2006). Isolation and Characterization of *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus casei* from Various Foods. *Turk J Biol*, 30, 39–44.
- Escobar, L. F. (2010). Evaluación del crecimiento de *Lactobacillus casei* y producción de ácido láctico usando como sustrato el suero de leche de vacuno. *Rev. Invest. Univ. Quindío*, 20, 42–49.

- Evangelista, R. M., Costa, O. A., Pereira, L., Ranisia., P., Pinto, S. M., & Abreu, L. R. (2010). Caracterização química de doces de leite comercializados a granel em Lavras /MG. *Rev. Inst. Latic.* “*Cândido Tostes*”, 377(65), 5–8.
- FAO/ WHO. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization.(2001). Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf.
- FDA. Food and Drug Administration. U.S. (2009). Consumer Health Information: Problems Digesting Dairy Products?. 2pp. www.fda.gov/consumer.
- Fox, P. F and Mcsweeney, P. L. H. (2009). *Advanced Dairy Chemistry: Lactose, water, salts and minor constituents*, Third Edit, Springer, Cork, Ireland., 793 pp.
- Ferreira, L. D. O., Pimenta, C. J., Santos, G., Ramos, T. de M., Pereira, P. A. P., & Pinheiro, A. C. M. (2012). Adição de soro de leite e café na qualidade do doce de leite pastoso. *Ciência Rural, Santa Maria*, 42(7), 1314–1319.
- Ferreira, L. de Oliveira, Pereira, P. aparecida pimenta, Maria, J., & Pinto, S. M. (2012a). Avaliação das características de qualidade de doces de leite comerciais. *Rev. Inst. Latic “Candido Tostes”*, 387(67), 5–11.
- Ferreira, L. O., Pimenta, C. J., Carla, A., Pinheiro, M., Aparecida, P., Pereira, P., & Santos, G. (2011). Sensory evaluation of “ dulce de leche ” with coffee and whey using different affective data analysis methods. *Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas*, 31(4), 998–1005.
- Ferreira, O. L., Pimenta, C. J., Rezende, C. S., & Roseane, E. M. (2012b). Avaliação físico-química e sensorial de doce de leite elaborado com extrato hidrossolúvel de soja e soro de leite sabor café. *Campina Grande*, 14(3), 251–259.
- Friedman, H., & Whitney, J. E. (1962). The Texturometer-A New Instrument Objective Texture Measurement, 390–396.
- Gänzle, M. G., Haase, G., & Jelen, P. (2008). Lactose: Crystallization, hydrolysis and value-added derivatives. *International Dairy Journal*, 18(7), 685–694.
- Garitta, L., Hough, G., & Sánchez, R. (2004). Sensory shelf life of dulce de leche. *Journal of Dairy Science*, 87(6), 1601–1607.
- Gelegenis. J, Georgakakis. D, Angelidaki. I and Mavris. V. 2007. Optimization of biogas production by co-digesting whey with diluted poultry manure. *Science direct*, 32, 2147–2160.
- García, A. D., & Jerez, J. R. (2004). Modelamiento del efecto de la temperatura y el pH en el crecimiento y producción de blis del *lactobacillus casei* y optimización de los parámetros

- propuestos. Tesis de pregrado. Universidad de la sabana chía - Cundinamarca, Colombia. 82 pp.
- Gibson, G. R and Roberfroid, M.B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*, 125(6), 1401–1412.
- Gimenez, A., Ares, G., & Gambaro, A. (2007). Consumer perception of sandiness in dulce de leche. *Journal of Sensory Studies*, 23(2), 171–185.
- Giménez, A., Ares, G., & Gámbaro, A. (2008). Consumer reaction to changes in sensory profile of dulce de leche due to lactose hydrolysis. *International Dairy Journal*, 18(9), 951–955.
- Giraldo-Zuñiga, A. D., Reis, J. S; Gomes, J. C; Minim, L. A., Garcia, R. E. E.(2002). Propriedades funcionais e nutricionais das proteínas do soro de leite. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, 57(325), 35-46.
- Guergoletto, K. B., Magnani, M., Martin, J. S., Andrade, C. G. T. D. J., & Garcia, S. (2010). Survival of *Lactobacillus casei* (LC-1) adhered to prebiotic vegetal fibers. *Innovative Food Science Emerging Technologies*, 11(2), 415–421.
- Guimaraes, W. V. Dudey, G. L. Ingram, L.O. (1992). Fermentation of sweet whey by ethanologenic. *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng*, 40, 41 – 45.
- Henno, M., Ots, M., Jõudu, I., Kaart, T., & Kärt, O. (2008). Factors affecting the freezing point stability of milk from individual cows. *International Dairy Journal*, 18(2), 210–215.
- Hentges, D, Silva, D. ., Zonta, M. ., Dias, P. ., Conceicao, R. C. ., & Timm, C. D. (2008). Sobrevivencia de *Escherichia coli* O157: H7 em doce de leite. *Anais do 2 Simpósio de segurança alimentar.*, (53), 6.
- Hentges, Denise, Silva, D. T. Da, Dias, P. A., Conceição, R. D. C. D. S. Da, Zonta, M. N., & Timm, C. D. (2010). Pathogenic microorganism survival in dulce de leche. *Food Control*, 21(9), 1291–1293.
- Hynes, E and Zalazar, C. (2009). Lactose: en dulce de leche. In: Fox, P.F. and Mcsweeney, P.L.H. eds. *Advanced Dairy Chemistry*, 3rd ed. New York, Springer, vol. 3. 793 pp.
- Homayouni, A.M, Ehsani.R, Azizi. A, Razavi. S.H and Yarmand. M.S. (2008a). Spectrophotometrically evaluation of probiotic growth in liquid media. *Asian Journal of Chemistry*, 20(3), 2414–2420.
- Homayouni, A, Azizi. A, Ehsani. M.R, Yarmand. M.S and Razavi. S.H. (2008b). Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. *Food Chemistry*, 111(1), 50-55.

- Homayouni, A., Ehsani, M. R., Azizi, A., Yarmand, M. S. & Razavi, S. H. (2007). Selection of appropriate probiotic strains for use in ice cream. In Proceedings of the Third IDF International Symposium on Ice Cream. 124 pp.
- Hough, G., Moro, O., Segura, J., & Calvo, N. (1988). Flow Properties of Dulce de Leche, a Typical Argentine Dairy Product. *Journal of Dairy Science*, 71(7), 1783–1788.
- Hough, G., Martinez, E., & Contarini, A. (1990). Sensory and Objective Measurement of Sandiness in Dulce de Leche, a Typical Argentine Dairy Product. *Journal of Dairy Science*, 73(3), 604–611.
- Jaworska, D., Neffe, K., Kołożyn-Krajewska, D., & Dolatowski, Z. (2011). Survival during storage and sensory effect of potential probiotic lactic acid bacteria *Lactobacillus acidophilus* Bauer and *Lactobacillus casei* Bif3'/IV in dry fermented pork loins. *International Journal of Food Science & Technology*, 46(12), 2491–2497.
- Jha, S. N. (2010). Nondestructive Evaluation of Food Quality. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg: 288 Pp.
- Jelen, P., & Tossavainen, O. (2003). Low lactose and lactose-free milk and dairy products - prospects , technologies and applications. *Australian Journal of Dairy Technology*, 58(2), 161–165.
- Keating, P. F. 1999. Introducción a la lactología. 2 ed. Editorial Limusa, México., 267 pp.
- Kilcast, D., & Subramaniam, P. (2000). The stability and shelf-life of food Edited by (Second edi. Boca Raton FL: CRC Press. 344 pp.
- Klein, M. P., Jong, E. V. de, & Révillion, J. P. P. (2010). Utilização Da -Galactosidase Para Prevenção Da Cristalização Em Doce De Leite. *Ciênc. agrotec., Lavras*, 34(6), 1530–1535.
- Konkel, F. E., Rodrigues, S. M., Silva, D. R., & Demiate, I. M. (2004). Avaliação sensorial de doce de leite pastoso com diferentes concentrações de amido. *Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas*, 24(2), 249–254.
- Lara, J. A y Martinez, F. E. 2004. Boletín De Economía. Unidad de investigaciones económicas UIE. Departamento de economía. Vol VII, no. 2. Universidad de Puerto Rico – recinto Rio Piedras.
- Leite, D. E. D. D. E., Composição, P., & Pedroso, R. A. (2001). Avaliação da qualidade de amostras comerciais de doce de leite pastoso - composição química 1, 21(1), 108–114.
- LLC, JH., & VA, P. R. (2012). Generally Recognized as Safe (GRAS) Determination for the Use of *Lactobacillus casei* Strain Shirota As a Food Ingredient. Division of Biotechnology and GRAS Notice. Yakult Honsha Co, Tokyo Japan, 126 pp.

- Madrona, G. S., Zotarelli, M. F., Bergamasco, R., & Branco, I. G. (2009). Estudo do efeito da adição de soro de queijo na qualidade sensorial do doce de leite pastoso Study on the effect of the addition of whey in the sensorial quality of creamy dulce de leche. *Campinas*, 29(4), 826–833.
- Magerramov, M. a., Abdulagatov, a. I., Azizov, N. D., & Abdulagatov, I. M. (2007). Effect of temperature, concentration, and pressure on the viscosity of pomegranate and pear juice concentrates. *Journal of Food Engineering*, 80(2), 476–489.
- Martinez, E., Hough, G., & Contarini, A. (1990). Sandiness Prevention in Dulce de Leche by Seeding with Lactose Microcrystals. *Journal of Dairy Science*, 73(3), 612–616.
- Martins, S. I. (2003). Unravelling the Maillard reaction network by multiresponse kinetic modelling. Thesis Ph.D., Wageningen University, The Netherlands., 178 pp.
- Mcguire, R. G. (1992). Reporting of Objective Color Measurements. *Hortscience*, 27(12), 1254–1255.
- Mielgaard, M., Civille. G.V, and Carr. B.T. (2006). Sensory Evaluation Techniques. Fourth edition. CRC Press.464 pp.
- Milagres, M. P., Dias, G., Araujo, M., Silva, M. O., & Ramos, A. M. (2010). Análise físico-química e sensorial de doce de leite produzido sem adição de sacarose. *Rev. Ceres, Viçosa*, 4, 439–445.
- Morgan, F., Nouzille, C. A. P., Baechler, R., Vuataz, G., & Raemy, A. (2005). Lactose crystallisation and early Maillard reaction in skim milk powder and whey protein concentrates. *Lait*, 85, 315–323.
- Moro, O., & Hough, G. (1985). Total Solids and Density Measurements of Dulce de Leche, a Typical Argentine Dairy Product. *Journal of Dairy Science*, 68(3), 521–525.
- Novoa C. F. (1993).Memorias, Seminario Taller Elaboración de Dulces de Leche. Bogotá. Universidad Nacional de Colombia Vicerrectoría Académica. Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos.
- NTC 3757/ICONTEC -. Instituto Colombiano de Normas Tecnicas y Certificación: Arequipe o dulce de leche y manjar blanco. (2008). Bogotá, 9pp.
- Obando, C. M., Brito, C. C. S., Baez, M. L. A., Schobitz, T. R. P., & Horzella, M. Y. (2010). viabilidad de los microorganismos probióticos *Lactobacillus casei* 01 , *Lactobacillus acidophilus* la-5 , *Bifidobacterium* bb12 durante el almacenamiento de queso cottage. *Vitae, Revista De La Facultad De Química Farmacéutica*, 17(2), 141–148.

- ORIL - Oficina Para La Reglamentacion De La Industria Lechera. (2011). Informe anual año fiscal 2010 - 2011. Estado Libre Asociado De Puerto Rico Departamento De Agricultura, San Juan, Puerto Rico, 76 pp.
- Pauletti, M., Venier, A., Sabbag, N., & Stechina, D. (1990). Rheological Characterization of Dulce de Leche, a Confectionery Dairy Product. *Journal of Dairy Science*, 73(3), 601–603.
- Pereira, A. L. F., Maciel, T. C., & Rodrigues, S. (2011). Probiotic beverage from cashew apple juice fermented with *Lactobacillus casei*. *Food Research International*, 44(5), 1276–1283.
- Perrone, Í. T. (2006). efeito da nucleação secundária sobre a cristalização do doce de leite. Tesis M.S. Universidade Federal de Lavras, Lavras Brasil., 60 pp.
- Pieretti, G. G., Seollin, V. J., Bento, R. S., Michika, J. M., Madrona, G. S., & Santos, R. D. (2012). Doce de leite pastoso elaborado com açúcar mascavo: avaliação sensorial, físico-química e microbiológica. *Rev. Inst. Latic. “Cândido Tostes”*, 390(68), 59–64.
- Pinkerton, F., & Peters, I. I. (1958). Conductivity, Per Cent Lactose, and Freezing Point of Milk. *Journal of Dairy Science*, 41(3), 392–397.
- Polat, Z. (2009). Integrated approach to whey utilization through natural zeolite adsorption /desorption and fermentation, Thesis PH.D, Izmir University, Turkey. 209 pp.
- Queiroz, N. M., Martin, E., Santos, A., & Vasconcellos, M. (2009). Avaliação das Características Físico-Químicas e Sensoriais de Doce de Leite Diet Fabricado com Sucralose, Litesse® e Lactitol. *Ciênc. Biol. Saúde*, 11(1), 21–25.
- Rodríguez, A., Piagentini, A., Rozycki, S., Lema, P., Pauletti, M., & Panizzolo, L. (2012). Evolución del desarrollo del color en sistema modelo de composición similar al dulce de leche . Influencia del tiempo de calentamiento y del pH Materiales y Métodos. *Revista del Laboratorio Tecnológico del Uruguay*, (7), 38–42.
- Rosa, P. R. F. (2010). Produção de probióticos com *Lactobacillus* imobilizados em alginato de cálcio empregando soro de queijo. Tesis M.S. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia – MG., 123pp.
- Rovedo, C. O., Viollaz, P. E., & Suarez, C. (1991). The Effect of pH and Temperature on the Rheological Behavior of Dulce De Leche, A Typical Dairy Argentine Product. *Journal of Dairy Science*, 74(5), 1497–1502.
- Rozycki, S. D. (2003). Influencia de la etapa transiente de calentamiento sobre los parámetros cinéticos de desarrollo de color en dulce de leche. *Revista Argentina de Lactología*, 22, 12.
- Sabioni, J. G., Silva, D. O., Pinheiro, A. J. R., Borges, A. C., & Chaves, J. B. P. (1984a). Control of Lactose Crystallization in “Dulce de Leche” by *Kluyveromyces lactis* Fermentation. *Journal of Dairy Science*, 67(8), 1694–1698.

- Sabioni, J. G., Pinheiro, A. J. R., Silva, D. O., Chaves, J. B. P., & Borges, A. C. (1984b). Control of Lactose Crystallization in “Dulce de Leche” by Beta-D-Galactosidase Activity from Permeabilized *Kluyveromyces lactis* Cells. *Journal of Dairy Science*, 67(10), 2210–2215.
- Sanz. Y. (2007). Ecological and functional implications of the acid-adaptation ability of Bifidobacterium: A way of selecting improved probiotic strains. *International Dairy Journal*, 17(11), 1284–1289.
- Sato, H., Torimura, M., Kitahara, M., Ohkuma, M., Hotta, Y., & Tamura, H. (2012). Characterization of the Lactobacillus casei group based on the profiling of ribosomal proteins coded in S10-spc-alpha operons as observed by MALDI-TOF MS. *Systematic and applied microbiology*, 35(7), 447–54.
- Saxelin. M, Korpela. R and Mayara-Makinen. A.(2003). Introduction: Classifying functional dairy products, CRC Press, Boca Raton,FL, 1–16 pp.
- Schmidt, R. Packard, V and Morris, Ho. (1984). Effect of processing on whey protein functionality. *Journal of Dairy Science*, 67: 2723-2733.
- Scott, R. (1991). Fabricación de queso. Acribia, S.A, Zaragoza,,518 pp.
- Silva, T.J.P. (1980). Utilizacao dabeta-D-glactosidase no processo continuo de fabricacao do doce de leite homogeneizado. Tesis M.S. Universidade Federal de Viçosa , Vicosá, Brazil.61 pp.
- Silva, R. C., Barbosa, joao B., Firmino, F. C., & Caldoncelli, L. L. (2011). Qualidade microbiológica de requeijão e doce de leite pastoso produzidos em tocantins – MG. *Ciencias biologicas e da saude*, 1(1), 92–98.
- Siso, M. I. G. (1996). The biotechnological utilization of cheese whey: A review. *Bioresour. Technol.* 57, 1 – 11.
- Shipe, W. F. (1959). The Freezing Point of Milk. A Review. *Journal of Dairy Science*, 42(11), 1745–1762.
- Sousa, C. L., Neves, E. C. A., Carneiro, C. A. A., Peixoto, M. R. S., & Farias, J. B. (2002). Avaliação microbiológica e físico-química de doce de leite e requeijão produzidos com leite de búfala na ilha do marajó- pa la. B. *CEPPA Curitiva*., 20(2), 191–202.
- Spălățelu, C. (2012). Biotechnological Valorisation of Whey. *Innovative Romanian Food Biotechnology*, 10, 1 – 8.
- Talwalkar, A. Miller, C. W. Kailasapathy, K and Nguyen, M. H. (2004). Effect of packaging materials and dissolved oxygen on the survival of probiotic bacteria in yoghurt. *International Journal of Food Science and Technology*, 39(6), 605–611pp.

- Timm, C., Conceicao, R. de C. S., Coelho, F. J. O., Roos, T. B., Tejada, T. S., Quevedo, P. S., Hentges, A., et al. (2007). Microbiology quality evaluation of pasty doce de leite. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 66(3), 275–277.
- United States Department of Agriculture, USDA; (2008). Whey to Ethanol : A Biofuel Role for Dairy Cooperatives; National Agricultura Library. Agricultural Research Service. 27pp.
- Valencia, G. E. F., Cardona, M. J. L., & Ramirez, R. N. (2008). Evaluacion de los efectos de las propiedades fisicoquímicas, sensoriales y texturales de polidextrosa , fructosa y sorbitol como sustitutos de azúcar en la elaboración de arequipe. *Revista Lasallista De Investigación*, 5(2), 20–27.
- Valencia, G. F., & Millán, L. de J. (2009). Estimacão da vida útil de um doce de leite baixo em calorias. *Lasallista Investig*, 6(1), 10.
- Varela-Villamor. S. F. (2006). El mercado de productos gourmet en Puerto Rico. Instituto español de comercio exterior (IECE). Oficina Económica y Comercial de España en San Juan de Puerto Rico. 69pp.
- Walstra. P, Wouters. J. T. M, and Tom J. Geurts. T. J. (2005). Dairy Science and Technology, Second Edition, CRC Press. Boca Raton. FL., 768 pp.
- Watts, B. M., Ylimaki, G. L., & Jeffery, L. E. (1992). *Métodos sensoriales ! básicos para la evaluación de alimentos*, Ottawa, Canadá., 184 pp.
- Wit, D. J. N. de. (2001). Lecturer's Handbook on whey and whey products, First Edit, European Whey Products Association, Brussels - Belgium., 91pp.
- Zayed, G., & Roos, Y. H. (2004). Influence of trehalose and moisture content on survival of *Lactobacillus salivarius* subjected to freeze-drying and storage. *Process Biochemistry*, 39(9), 1081–1086.
- Zimmermann, J., Gris, E. F., Schwinden, E. P., Castanho, Ambon Renata Dias. Manique, B. L., Sidinei, C. E., & Bordignon-Luiz, M. (2007). propriedades físico-químicas, sensorais e reológicas de doce de leite com goma xantana e concentrado protéico de soro. *UEPG Ci. Exat as Terra, Ci. Agr . Eng*, 13(3), 53–59.

9. APÉNDICE

9.1. Propiedades del suero, leche y mantequilla utilizada en la elaboración de dulce de leche.

Tabla. 19. Propiedades de la materia prima utilizada.

	pH	% Acidez Titulable	% Grasa
SUERO	6.34	0.14	0.5
LECHE	6.62	0.16	3.3
MANTEQUILLA	-	-	78

9.2. Características Físico químicas de la goma Agar Agar 100-44 HG

Tabla. 20. Información nutricional de tic Pretested® Agar Agar 100-44 HG

INFORMACIÓN NUTRICIONAL DE TIC Pretested® Agar Agar 100-44 HG					
Calorías (total)	340 Kcal	Sodio	487mg	Fibra dietaría insoluble	0.0g
% calorías de grasa	0.00%	Potasio	30mg	Carbohidratos simples	0g
Calorías de grasa	0.00Kcal	Calcio	109mg	Carbohidratos complejos	0g
Total grasa	0.00g	Carbohidratos totales	85.00g	Proteína	0g
Grasa trans	0.00g	Fibra dietaría soluble	85g	Vitaminas, otros minerales	ND*
Colesterol	0mg				

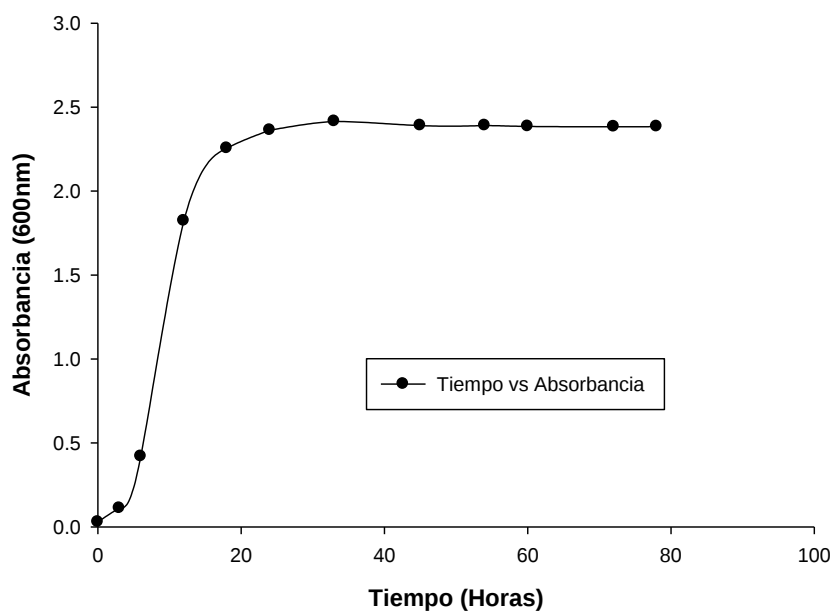
*No determinado

Especificaciones del producto facilitadas por TIC GUMS.

9.3. Determinación de la curva de crecimiento de *Lactobacillus casei*.

Tabla. 21. Datos de crecimiento de *Lactobacillus casei* en caldo MRS a 35°C, a 600nm

Tiempo	Absorbancia 600nm	CFU/mL
0	0.029	5.9x 10 ⁶
3	0.111	4.9x 10 ⁷
6	0.420	1.3x 10 ⁸
12	1.823	7.8x 10 ⁸
18	2.255	1.96x 10 ⁹
24	2.363	2.01x 10 ⁹
33	2.415	1.3x 10 ⁹
45	2.390	1.04x 10 ⁹
54	2.390	8.4x 10 ⁸
60	2.385	1.4x 10 ⁹
72	2.383	1.5x 10 ⁹
78	2.384	1.6x 10 ⁹



Gráfica 20. Curva de crecimiento de *Lactobacillus casei* a 35°C en caldo MRS.

9.4. Análisis estadístico

9.4.1. Análisis Físico Químico Del Dulce De Leche Con Probióticos

Variable dependiente: PH

Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	94	9839.22	<0.0001
TRATAMIENTO	1	94	5.81	0.0179
TIEMPO	5	94	3.56	0.0054
TRATAMIENTO:TIEMPO	5	94	1.00	0.4247

Medias ajustadas y errores estándares para TRATAMIENTO

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

TRATAMIENTO	Medias	E.E.	
C	5.92	0.06	A
P	5.88	0.06	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Medias ajustadas y errores estándares para TIEMPO*TRATAMIENTO

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

TIEMPO	TRATAMIENTO	Medias	E.E.					
10	C	6.00	0.07	A				
40	C	5.96	0.07	A	B			
40	P	5.95	0.07	A	B	C		
20	C	5.93	0.07	A	B	C	D	
60	C	5.92	0.07	A	B	C	D	E
10	P	5.88	0.07		B	C	D	E
0	C	5.88	0.07		B	C	D	E
60	P	5.87	0.07		B	C	D	E
20	P	5.87	0.07			C	D	E
80	P	5.85	0.07				D	E
80	C	5.84	0.07					E
0	P	5.83	0.07					E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Variable dependiente: BRIX

Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	94	3256.12	<0.0001
TRATAMIENTO	1	94	104.66	<0.0001
TIEMPO	5	94	1.50	0.1961
TRATAMIENTO:TIEMPO	5	94	0.32	0.8990

Medias ajustadas y errores estándares para TRATAMIENTO

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

TRATAMIENTO	Medias	E.E.	
C	67.97	1.18	A
P	65.84	1.18	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Medias ajustadas y errores estándares para TIEMPO*TRATAMIENTO

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

TIEMPO	TRATAMIENTO	Medias	E.E.	
80	C	68.39	1.22	A
20	C	68.22	1.22	A
40	C	68.22	1.22	A
10	C	67.89	1.22	A
60	C	67.61	1.22	A
0	C	67.50	1.22	A
20	P	66.39	1.22	B
80	P	66.06	1.22	B
40	P	65.78	1.22	B
0	P	65.67	1.22	B
60	P	65.67	1.22	B
10	P	65.50	1.22	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Variable dependiente: Aw

Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	94	4202.51	<0.0001
TRATAMIENTO	1	94	71.49	<0.0001
TIEMPO	5	94	4.97	0.0004
TRATAMIENTO:TIEMPO	5	94	0.91	0.4765

Medias ajustadas y errores estándares para TRATAMIENTO

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

TRATAMIENTO	Medias	E.E.	
P	0.77	0.01	A
C	0.75	0.01	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Medias ajustadas y errores estándares para TIEMPO*TRATAMIENTO

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

TIEMPO	TRATAMIENTO	Medias	E.E.			
60	P	0.77	0.01	A		
0	P	0.77	0.01	A		
80	P	0.77	0.01	A	B	
10	P	0.77	0.01	A	B	
40	P	0.76	0.01	A	B	
20	P	0.76	0.01	A	B	
0	C	0.76	0.01		B	
60	C	0.76	0.01		B	
80	C	0.74	0.01			C
40	C	0.74	0.01			C
20	C	0.74	0.01			C
10	C	0.74	0.01			C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Variable dependiente: L

Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	94	878.12	<0.0001
TRATAMIENTO	1	94	7.86	0.0061
TIEMPO	5	94	5.49	0.0002
TRATAMIENTO:TIEMPO	5	94	0.42	0.8327

Medias ajustadas y errores estándares para TRATAMIENTO

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

TRATAMIENTO	Medias	E.E.	
P	29.65	1.00	A
C	28.50	1.00	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Medias ajustadas y errores estándares para TIEMPO*TRATAMIENTO

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

TIEMPO	TRATAMIENTO	Medias	E.E.			
20	P	31.31	1.19	A		
20	C	30.52	1.19	A	B	
80	P	30.52	1.19	A	B	
60	P	29.57	1.19	A	B	C
0	P	29.47	1.19	A	B	C
60	C	29.30	1.19		B	C
40	P	28.91	1.19		B	C
80	C	28.35	1.19			C
0	C	28.12	1.19			C
10	P	28.11	1.19			C
40	C	28.00	1.19			C
10	C	26.68	1.19			D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Variable dependiente: matiz (°H)**Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)**

	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	94	2607.43	<0.0001
TRATAMIENTO	1	94	32.46	<0.0001
TIEMPO	5	94	2.35	0.0469
TRATAMIENTO:TIEMPO	5	94	5.50	0.0002

Medias ajustadas y errores estándares para TRATAMIENTO

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

TRATAMIENTO	Medias	E.E.	
C	49.24	0.96	A
P	48.02	0.96	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)**Medias ajustadas y errores estándares para TIEMPO*TRATAMIENTO**

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

TIEMPO	TRATAMIENTO	Medias	E.E.				
80	C	50.79	1.02	A			
0	C	49.46	1.02		B		
20	C	49.29	1.02		B		
60	C	48.86	1.02		B	C	
60	P	48.83	1.02		B	C	
40	C	48.57	1.02		B	C	
0	P	48.51	1.02		B	C	D
10	C	48.49	1.02		B	C	D
10	P	48.15	1.02			C	D
40	P	47.90	1.02			C	D
80	P	47.49	1.02				D
20	P	47.25	1.02				D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)**Variable dependiente: Saturación o croma (Cab)****Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)**

	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	94	272.73	<0.0001
TRATAMIENTO	1	94	21.84	<0.0001
TIEMPO	5	94	1.62	0.1630
TRATAMIENTO:TIEMPO	5	94	2.27	0.0540

Medias ajustadas y errores estándares para TRATAMIENTO

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

TRATAMIENTO	Medias	E.E.	
C	17.31	1.02	A
P	15.96	1.02	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)**Medias ajustadas y errores estándares para TIEMPO*TRATAMIENTO**

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

TIEMPO	TRATAMIENTO	Medias	E.E.			
40	C	18.14	1.12	A		
10	C	17.92	1.12	A		
20	C	17.72	1.12	A	B	
80	C	17.53	1.12	A	B	
0	C	16.81	1.12	A	B	C
0	P	16.48	1.12		B	C
10	P	16.34	1.12		B	C
80	P	16.00	1.12			C
60	P	15.88	1.12			C
60	C	15.72	1.12			C
40	P	15.60	1.12			C
20	P	15.44	1.12			C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Variable dependiente: adhesividad

Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	94	5.02	0.0274
TRATAMIENTO	1	94	18.19	<0.0001
TIEMPO	5	94	4.90	0.0005
TRATAMIENTO:TIEMPO	5	94	1.43	0.2193

Medias ajustadas y errores estándares para TRATAMIENTO

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

TRATAMIENTO	Medias	E.E.	
C	-17.20	9.69	A
P	-25.97	9.69	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Medias ajustadas y errores estándares para TIEMPO*TRATAMIENTO

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

TIEMPO	TRATAMIENTO	Medias	E.E.				
0	C	-9.97	10.22	A			
40	C	-14.03	10.22	A	B		
0	P	-15.43	10.22	A	B	C	
80	C	-18.05	10.22	A	B	C	D
10	C	-19.19	10.22	A	B	C	D
20	C	-19.56	10.22	A	B	C	D
20	P	-21.50	10.22		B	C	D
60	C	-22.38	10.22		B	C	D
10	P	-24.37	10.22			C	D
80	P	-25.75	10.22				D
40	P	-30.69	10.22				E
60	P	-38.09	10.22				F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Variable dependiente: cohesividad

Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	94	4261.74	<0.0001
TRATAMIENTO	1	94	0.72	0.3985
TIEMPO	5	94	1.96	0.0920
TRATAMIENTO:TIEMPO	5	94	1.23	0.3013

Medias ajustadas y errores estándares para TRATAMIENTO

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

TRATAMIENTO	Medias	E.E.	
C	0.70	0.01	A
P	0.69	0.01	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Medias ajustadas y errores estándares para TIEMPO*TRATAMIENTO

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

TIEMPO	TRATAMIENTO	Medias	E.E.		
80	C	0.75	0.03	A	
40	C	0.74	0.03	A	
10	C	0.72	0.03	A	B
10	P	0.72	0.03	A	B
40	P	0.72	0.03	A	B
0	C	0.71	0.03	A	B
0	P	0.70	0.03	A	B
20	P	0.68	0.03	A	B
60	P	0.67	0.03	A	B
80	P	0.66	0.03		B
20	C	0.65	0.03		B
60	C	0.65	0.03		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Variable dependiente: dureza

Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	94	26.71	<0.0001
TRATAMIENTO	1	94	26.13	<0.0001
TIEMPO	5	94	5.30	0.0002
TRATAMIENTO:TIEMPO	5	94	0.32	0.8999

Medias ajustadas y errores estándares para TRATAMIENTO

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

TRATAMIENTO	Medias	E.E.	
P	12.18	2.12	A
C	9.51	2.12	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Medias ajustadas y errores estándares para TIEMPO*TRATAMIENTO

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

TIEMPO	TRATAMIENTO	Medias	E.E.					
60	P	14.56	2.27	A				
20	P	13.23	2.27	A	B			
40	P	12.54	2.27	A	B	C		
10	P	12.32	2.27	A	B	C		
60	C	11.46	2.27		B	C	D	
80	P	10.90	2.27		B	C	D	
20	C	10.19	2.27			C	D	E
0	P	9.56	2.27				D	E
10	C	9.22	2.27				D	E
40	C	9.22	2.27				D	E
80	C	9.21	2.27				D	E
0	C	7.74	2.27					E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

9.4.2. Análisis Proximal Dulce De Leche Con Probióticos En Base Humeda

Variable dependiente: humedad

Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	30	18239.5	<0.0001
tratamiento	1	30	9.0	0.0053
tiempo	1	30	23.5	<0.0001
tratamiento:tiempo	1	30	15.3	0.0005

Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
p	21.1	0.2	A
c	20.1	0.2	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Medias ajustadas y errores estándares para tiempo*tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tiempo	tratamiento	Medias	E.E.	
0	p	22.4	0.3	A
0	c	20.3	0.3	B
80	c	20.0	0.3	B
80	p	19.7	0.3	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Variable dependiente: ceniza

Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	30	177.7	<0.0001
tratamiento	1	30	0.6	0.4308
tiempo	1	30	133.5	<0.0001
tratamiento:tiempo	1	30	3.1	0.0909

Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
p	2.1	0.2	A
c	2.0	0.2	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Medias ajustadas y errores estándares para tiempo*tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tiempo	tratamiento	Medias	E.E.	
0	c	2.3	0.2	A
0	p	2.3	0.2	A
80	p	1.8	0.2	B
80	c	1.7	0.2	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Variable dependiente: grasa

Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	30	1200.0	<0.0001
tratamiento	1	30	0.2	0.6960
tiempo	1	30	1.4	0.2469
tratamiento:tiempo	1	30	1.8	0.1913

Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
p	7.2	0.2	A
c	7.2	0.2	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Medias ajustadas y errores estándares para tiempo*tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tiempo	tratamiento	Medias	E.E.	
0	c	7.4	0.3	A
80	p	7.2	0.3	A
0	p	7.2	0.3	A
80	c	6.9	0.3	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Variable dependiente: proteina

Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	30	136.0	<0.0001
tratamiento	1	30	0.1	0.7139
tiempo	1	30	2.5	0.1229
tratamiento:tiempo	1	30	0.4	0.5450

Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
p	2.7	0.2	A
c	2.6	0.2	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Medias ajustadas y errores estándares para tiempo*tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tiempo	tratamiento	Medias	E.E.	
0	c	2.8	0.3	A
0	p	2.7	0.3	A
80	p	2.6	0.3	A
80	c	2.4	0.3	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Variable dependiente: carbohidratos

Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	30	57414.7	<0.0001
tratamiento	1	30	5.3	0.0290

tiempo	1	30	28.0	<0.0001
tratamiento:tiempo	1	30	2.7	0.1092

Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
c	68.1	0.4	A
p	67.0	0.4	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Medias ajustadas y errores estándares para tiempo*tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tiempo	tratamiento	Medias	E.E.	
80	c	68.9	0.5	A
80	p	68.6	0.5	A
0	c	67.2	0.5	B
0	p	65.4	0.5	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Variable dependiente: viscosidad

Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	30	9.85	0.0038
tiempo	1	30	110.99	<0.0001
tratamiento	1	30	1.88	0.1810
tiempo:tratamiento	1	30	1.87	0.1815

Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
c	33192.15	9767.32	A
p	25562.55	9767.32	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Medias ajustadas y errores estándares para tiempo*tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tiempo	tratamiento	Medias	E.E.	
80	c	66348.88	10531.83	A
80	p	51098.48	10531.83	A
0	c	35.42	10531.83	B
0	p	26.62	10531.83	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

9.4.3. Análisis Proximal En Base Seco De Dulce De Leche Con Probióticos

Variable dependiente: ceniza

Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	30	179.16	<0.0001
tratamiento	1	30	1.66	0.2078
tiempo	1	30	133.06	<0.0001
tratamiento:tiempo	1	30	1.00	0.3265

Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
p	2.62	0.20	A
c	2.53	0.20	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Medias ajustadas y errores estándares para tiempo*tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tiempo	tratamiento	Medias	E.E.	
0	p	2.96	0.20	A
0	c	2.94	0.20	A
80	p	2.27	0.20	B
80	c	2.12	0.20	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Variable dependiente: grasa

Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	30	1216.82	<0.0001
tratamiento	1	30	0.75	0.3930
tiempo	1	30	3.78	0.0611
tratamiento:tiempo	1	30	0.49	0.4913

Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
p	9.16	0.28	A

c	8.97	0.28	A
---	------	------	---

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Medias ajustadas y errores estándares para tiempo*tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tiempo	tratamiento	Medias	E.E.	
0	p	9.30	0.32	A
0	c	9.26	0.32	A
80	p	9.02	0.32	A
80	c	8.67	0.32	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Variable dependiente: proteina

Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	30	136.57	<0.0001
tratamiento	1	30	0.32	0.5766
tiempo	1	30	3.42	0.0744
tratamiento:tiempo	1	30	0.12	0.7339

Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
p	3.36	0.30	A
c	3.25	0.30	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Medias ajustadas y errores estándares para tiempo*tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tiempo	tratamiento	Medias	E.E.	
0	p	3.51	0.33	A
0	c	3.47	0.33	A
80	p	3.21	0.33	A
80	c	3.03	0.33	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Variable dependiente: carbohidratos

Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	denDF	F-value	p-value
--	-------	-------	---------	---------

(Intercept)	1	30	68543.43	<0.0001
tratamiento	1	30	1.16	0.2899
tiempo	1	30	18.70	0.0002
tratamiento:tiempo	1	30	0.64	0.4285

Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamiento	Medias	E.E.	
c	85.25	0.37	A
p	84.87	0.37	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Medias ajustadas y errores estándares para tiempo*tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tiempo	tratamiento	Medias	E.E.	
80	c	86.18	0.45	A
80	p	85.50	0.45	A
0	c	84.33	0.45	B
0	p	84.23	0.45	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

9.4.4. Análisis fisicoquímico de los cuatro tratamientos de dulce de leche

Variable dependiente: PH

Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	158	27927.10	<0.0001
TRATAMIENTO	3	158	3.19	0.0253
TIEMPO	4	158	6.85	<0.0001
TRATAMIENTO:TIEMPO	12	158	0.44	0.9453

Medias ajustadas y errores estándares para TRATAMIENTO

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

TRATAMIENTO	Medias	E.E.	
100	6.16	0.01	A
50	6.12	0.01	B
0	6.09	0.01	B C
75	6.08	0.01	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Medias ajustadas y errores estándares para TIEMPO*TRATAMIENTO

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

TIEMPO	TRATAMIENTO	Medias	E.E.						
0	50	6.14	0.06	A					
0	0	6.13	0.06	A					
8	0	6.11	0.06	A	B				
0	75	6.10	0.06	A	B				
8	75	6.10	0.06	A	B				
29	0	6.08	0.06	A	B	C			
15	0	6.07	0.06	A	B	C			
0	100	6.06	0.06	A	B	C	D		
8	50	6.06	0.06	A	B	C	D	E	
29	100	6.06	0.06	A	B	C	D	E	
29	75	6.03	0.06	A	B	C	D	E	
15	50	6.03	0.06	A	B	C	D	E	
22	0	6.02	0.06	A	B	C	D	E	F
29	50	6.01	0.06	A	B	C	D	E	F
8	100	5.99	0.06		B	C	D	E	F
15	100	5.96	0.06			C	D	E	F
15	75	5.96	0.06			C	D	E	F
22	50	5.94	0.06				D	E	F
22	75	5.93	0.06					E	F
22	100	5.89	0.06						F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Variable dependiente: BRIX

Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	158	24831.80	<0.0001
TRATAMIENTO	3	158	14.32	<0.0001
TIEMPO	4	158	0.86	0.4877
TRATAMIENTO:TIEMPO	12	158	0.74	0.7071

Medias ajustadas y errores estándares para TRATAMIENTO

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

TRATAMIENTO	Medias	E.E.	
75	71.17	0.20	A
100	70.50	0.20	B
50	65.67	0.20	C
0	65.04	0.24	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Medias ajustadas y errores estándares para TIEMPO*TRATAMIENTO

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

TIEMPO	TRATAMIENTO	Medias	E.E.	
0	75	70.17	0.89	A
0	100	70.11	0.89	A

22	75	69.83	0.89	A	B									
8	100	69.67	0.89	A	B									
15	75	69.56	0.89	A	B									
8	75	69.39	0.89	A	B	C								
15	100	69.17	0.89	A	B	C	D							
29	75	69.17	0.89	A	B	C	D							
29	100	68.33	0.89	A	B	C	D	E						
22	50	68.33	0.89	A	B	C	D	E						
0	50	68.22	0.89	A	B	C	D	E						
8	50	68.06	0.89	A	B	C	D	E	F					
22	100	67.72	0.89		B	C	D	E	F	G				
29	0	67.22	0.89			C	D	E	F	G				
22	0	67.22	0.89			C	D	E	F	G				
29	50	67.17	0.89				D	E	F	G				
15	50	67.00	0.89				D	E	F	G				
0	0	66.78	0.89					E	F	G				
8	0	66.00	0.89						F	G				
15	0	65.78	0.89							G				

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Variable dependiente: *Aw*

Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	158	6877.36	<0.0001
TRATAMIENTO	3	158	34.25	<0.0001
TIEMPO	4	158	1.94	0.1065
TRATAMIENTO:TIEMPO	12	158	0.95	0.5008

Medias ajustadas y errores estándares para TRATAMIENTO

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

TRATAMIENTO	Medias	E.E.	
0	0.80	0.01	A
50	0.77	4.3E-03	B
100	0.72	4.3E-03	C
75	0.71	4.3E-03	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Medias ajustadas y errores estándares para TIEMPO*TRATAMIENTO

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

TIEMPO	TRATAMIENTO	Medias	E.E.			
22	0	0.80	0.01	A		
0	0	0.78	0.01	A	B	
29	0	0.78	0.01	A	B	
15	0	0.77	0.01		B	C
8	0	0.77	0.01		B	C
0	50	0.77	0.01		B	C
29	50	0.77	0.01		B	C
22	50	0.77	0.01		B	C

8	50	0.76	0.01	B	C	D			
15	50	0.75	0.01		C	D	E		
29	100	0.74	0.01		C	D	E		
15	100	0.74	0.01		C	D	E	F	
29	75	0.73	0.01			D	E	F	G
22	100	0.73	0.01				E	F	G
22	75	0.72	0.01				E	F	G
8	100	0.72	0.01				E	F	G
15	75	0.72	0.01				E	F	G
0	100	0.71	0.01					F	G
0	75	0.71	0.01						G
8	75	0.71	0.01						G

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Variable dependiente: L

Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	158	441.82	<0.0001
TRATAMIENTO	3	158	46.20	<0.0001
TIEMPO	4	158	32.55	<0.0001
TRATAMIENTO:TIEMPO	12	158	2.45	0.0058

Medias ajustadas y errores estándares para TRATAMIENTO

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

TRATAMIENTO	Medias	E.E.	
0	34.26	0.61	A
50	33.92	0.50	A
100	26.98	0.50	B
75	26.77	0.50	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Medias ajustadas y errores estándares para TIEMPO*TRATAMIENTO

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

TIEMPO	TRATAMIENTO	Medias	E.E.	
29	0	40.52	1.77	A
22	50	36.13	1.77	B
29	100	36.10	1.77	B
29	50	35.92	1.77	B
0	0	35.42	1.77	B
22	0	35.26	1.77	B
29	75	35.17	1.77	B
8	0	34.67	1.77	B
15	0	34.61	1.77	B
15	50	33.96	1.77	B
8	50	31.54	1.77	C
22	100	31.19	1.77	C D
15	100	30.49	1.77	C D E
8	100	29.79	1.77	C D E
0	50	29.75	1.77	C D E

0	100	29.72	1.77	C	D	E
15	75	29.04	1.77		D	E
0	75	29.03	1.77		D	E
22	75	28.85	1.77		D	E
8	75	28.67	1.77			E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Variable dependiente: Matiz (°H)

Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	158	904.82	<0.0001
TRATAMIENTO	3	158	5.38	0.0015
TIEMPO	4	158	20.70	<0.0001
TRATAMIENTO:TIEMPO	12	158	0.40	0.9623

Medias ajustadas y errores estándares para TRATAMIENTO

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

TRATAMIENTO	Medias	E.E.	
100	60.23	0.11	A
0	51.25	0.14	B
50	50.03	0.11	C
75	49.94	0.11	C

Medias ajustadas y errores estándares para TIEMPO*TRATAMIENTO

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

TIEMPO	TRATAMIENTO	Medias	E.E.			
29	100	54.55	1.89	A		
29	0	53.91	1.89	A		
29	50	52.98	1.89	A		
29	75	52.33	1.89	A	B	
0	0	49.95	1.89		B	C
8	0	49.90	1.89		B	C
0	100	49.79	1.89		B	C
15	0	49.76	1.89		B	C
22	0	49.60	1.89			C
22	100	49.32	1.89			C
8	100	49.02	1.89			C
15	100	48.82	1.89			C
22	50	48.82	1.89			C
0	50	48.23	1.89			C
22	75	48.14	1.89			C
8	75	48.05	1.89			C
15	75	47.97	1.89			C
0	75	47.62	1.89			C
15	50	47.45	1.89			C
8	50	46.19	1.89			D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Variable dependiente: Saturación o croma (Cab)

Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	158	162.17	<0.0001
TRATAMIENTO	3	158	1.91	0.1296
TIEMPO	4	158	19.65	<0.0001
TRATAMIENTO:TIEMPO	12	158	0.69	0.7627

Medias ajustadas y errores estándares para TRATAMIENTO

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

TRATAMIENTO	Medias	E.E.	
50	16.75	0.32	A
0	16.32	0.39	A
75	15.97	0.32	A
100	12.65	0.32	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Medias ajustadas y errores estándares para TIEMPO*TRATAMIENTO

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

TIEMPO	TRATAMIENTO	Medias	E.E.				
29	50	27.66	1.99	A			
29	0	24.64	1.99	A	B		
29	75	24.36	1.99	A	B		
29	100	23.50	1.99		B	C	
22	50	20.66	1.99			C	D
0	50	20.51	1.99			C	D
15	75	20.14	1.99			C	D
8	50	19.90	1.99				D
22	100	19.36	1.99				D
8	75	19.07	1.99				D
22	75	18.95	1.99				D
22	0	18.76	1.99				D
15	100	18.75	1.99				D
8	0	18.68	1.99				D
0	0	18.58	1.99				D
15	0	18.52	1.99				D
0	75	18.38	1.99				D
0	100	18.01	1.99				D
8	100	17.98	1.99				D
15	50	17.59	1.99				D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Variable dependiente: dureza

Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	140	278.32	<0.0001
TRATAMIENTO	3	140	42.69	<0.0001
TIEMPO	4	140	3.26	0.0136
TIEMPO:TRATAMIENTO	12	140	2.88	0.0014

Medias ajustadas y errores estándares para TRATAMIENTO

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

TRATAMIENTO	Medias	E.E.	
0	56.89	0.78	A
50	17.96	0.64	B
75	10.80	0.64	C
100	10.45	0.64	C

Medias ajustadas y errores estándares para TIEMPO*TRATAMIENTO

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

TIEMPO	TRATAMIENTO	Medias	E.E.					
29	0	75.35	4.95	A				
8	0	72.22	4.95	A				
22	0	71.55	4.95	A				
15	0	58.94	4.95		B			
0	0	42.05	4.95			C		
29	100	32.82	5.89			C	D	
29	75	30.90	4.95			C	D	
22	75	22.83	4.95				D	E
22	50	19.29	4.95				D	E
22	100	17.82	5.89				D	E
15	50	17.74	4.95					E
8	50	13.29	5.89					E
0	50	12.28	4.95					E
15	100	12.23	4.95					E
8	75	11.40	4.95					E
15	75	11.07	5.89					E
8	100	9.41	5.89					E
0	100	9.30	4.95					E
0	75	9.10	4.95					E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Variable dependiente: adhesividad

Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	143	87.33	<0.0001
TRATAMIENTO	3	143	241.36	<0.0001
TIEMPO	4	143	7.02	<0.0001
TRATAMIENTO:TIEMPO	12	143	3.25	0.0004

Medias ajustadas y errores estándares para TRATAMIENTO

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

TRATAMIENTO	Medias	E.E.	
100	-5.79	5.34	A
75	-23.53	5.34	B

50	-71.64	5.34	C
0	-246.92	6.27	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Medias ajustadas y errores estándares para TIEMPO*TRATAMIENTO

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

TIEMPO	TRATAMIENTO	Medias	E.E.		
0	100	-12.70	20.00	A	
15	100	-12.75	20.00	A	
8	100	-12.98	23.72	A	
22	100	-19.31	23.70	A	
0	75	-25.58	20.00	A	
22	50	-26.35	20.00	A	
15	75	-33.92	23.72	A	B
8	75	-36.13	20.00	A	B
22	75	-40.15	20.00	A	B
0	50	-41.44	20.00	A	B
29	75	-46.00	20.00	A	B
15	50	-47.02	20.00	A	B
8	50	-47.31	23.72	A	B
29	100	-85.91	23.72	B	
0	0	-200.15	20.00		C
15	0	-269.60	20.00		D
8	0	-270.85	20.00		D
22	0	-302.63	20.00		D
29	0	-380.63	20.00		E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Variable dependiente: cohesividad

Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	143	2857.80	<0.0001
TRATAMIENTO	3	143	14.19	<0.0001
TIEMPO	4	143	0.92	0.4521
TRATAMIENTO:TIEMPO	12	143	1.00	0.4534

Medias ajustadas y errores estándares para TRATAMIENTO

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

TRATAMIENTO	Medias	E.E.	
0	0.84	0.04	A
50	0.79	0.04	A
75	0.77	0.04	A B
100	0.66	0.04	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Medias ajustadas y errores estándares para TIEMPO*TRATAMIENTO

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

TIEMPO	TRATAMIENTO	Medias	E.E.						
0	75	0.87	0.04	A					
29	0	0.86	0.04	A					
0	0	0.82	0.04	A	B				
8	75	0.82	0.04	A	B				
15	0	0.81	0.04	A	B	C			
8	0	0.79	0.04	A	B	C	D		
22	75	0.79	0.04	A	B	C	D		
22	0	0.78	0.04	A	B	C	D		
29	75	0.75	0.04		B	C	D	E	
15	75	0.75	0.04		B	C	D	E	F
22	100	0.74	0.04		B	C	D	E	F
8	50	0.72	0.04		B	C	D	E	F
22	50	0.72	0.04			C	D	E	F
0	50	0.71	0.04			C	D	E	F
29	100	0.71	0.04			C	D	E	F
15	50	0.71	0.04				D	E	F
0	100	0.68	0.04					E	F
8	100	0.66	0.04					E	F
15	100	0.65	0.04						F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Variable dependiente: viscosidad

Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	5	917.39	<0.0001
TRATAMIENTO	3	5	150.77	<0.0001

Medias ajustadas y errores estándares para TRATAMIENTO

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

TRATAMIENTO	Medias	E.E.		
0	71.21	2.69	A	
50	53.41	2.20	B	
100	14.75	2.20		C
75	13.98	2.20		C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

9.4.5. Análisis proximal de los cuatro tratamientos dulce de leche

Variable dependiente: humedad

Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	5	4128.5	<0.0001
TRATAMIENTO	3	5	28.7	0.0014

Medias ajustadas y errores estándares para TRATAMIENTO

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

TRATAMIENTO	Medias	E.E.	
0	24.2	0.7	A
50	20.4	0.6	B
75	17.1	0.6	C
100	16.8	0.6	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Variable dependiente: ceniza

Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	5	4983.9	<0.0001
TRATAMIENTO	3	5	20.4	0.0031

Medias ajustadas y errores estándares para TRATAMIENTO

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

TRATAMIENTO	Medias	E.E.	
75	2.4	0.1	A
100	2.3	0.1	A
50	2.0	0.1	B
0	1.8	0.1	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Variable dependiente: grasa

Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	5	2405.4	<0.0001
TRATAMIENTO	3	5	11.1	0.0119

Medias ajustadas y errores estándares para TRATAMIENTO

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

TRATAMIENTO	Medias	E.E.	
100	7.8	0.2	A
0	6.9	0.3	B
75	6.8	0.2	B
50	6.1	0.2	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Variable dependiente: carbohidratos

pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	5	28379.3	<0.0001
TRATAMIENTO	3	5	43.3	0.0005

Medias ajustadas y errores estándares para TRATAMIENTO

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

TRATAMIENTO	Medias	E.E.	
100	72.1	0.8	A
75	70.9	0.8	A
50	66.2	0.8	B
0	59.7	0.9	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Variable dependiente: proteína

Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	5	679.3	<0.0001
TRATAMIENTO	3	5	139.3	<0.0001

Medias ajustadas y errores estándares para TRATAMIENTO

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

TRATAMIENTO	Medias	E.E.	
0	7.4	0.3	A
50	5.2	0.2	B
75	2.8	0.2	C
100	1.0	0.2	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

9.4.5. Análisis sensorial

Prueba de Friedman

100%	50%	75%	0%	T ²	p
2.27	2.50	2.67	2.57	2.43	0.0644

Minima diferencia significativa entre suma de rangos = 42.399

Tratamiento	Suma (Ranks)	Media (Ranks)	n	
100%	320.00	2.27	141	A

50%	352.00	2.50	141	A	B
0%	362.00	2.57	141	A	B
75%	376.00	2.67	141		B
<i>Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.050$)</i>					

9.5. Prueba de análisis sensorial

9.5.1. Hoja del panelista.

Universidad de Puerto Rico
Recinto Universitario de Mayagüez
Programa de Ciencia y Tecnología de
Alimentos

Prueba de Ordenamiento

Producto: **DULCE DE LECHE**

Atributo: **CARACTERISTICAS GENERALES**

Fecha _____

Num. De Panelista _____

Se le están entregando cuatro muestras de dulce de leche, codificadas con números de 3 dígitos. Escriba los números de las muestras en los espacios provistos en el orden que se le entregaron. Pruebe cada muestra **y evalúe cual muestra es de su mayor preferencia en términos generales**. Tome agua entre muestras para refrescar sus receptores. Asigne el valor de “1” a la muestra de menor preferencia y “4” a la muestra de mayor preferencia.

Muestra	_____	_____	_____	_____
Nivel de preferencia	_____	_____	_____	_____

Usted compraría este producto si se encontrara en el mercado? _____

Comentarios: _____

Tabla. 22. Comentarios de los panelistas del análisis sensorial.

100% suero	75% suero	50% suero	0% suero
Buen sabor textura gelatinosa muy sólido no empalaga muy dulce textura no común pero gusta es exquisito muy bien elaborados y deliciosos viscosidad perfecta parece manjar blanco color sabor agradable poco arenosa sabor ideal Leve sabor a mantequilla Mejor apariencia	Exente sabor y consistencia Gusta mucho su textura son productos suaves para el paladar demasiado viscoso buen sabor muy rico textura muy gomosa Se sienten grumos Muy líquido Bastante dulzor Muy amargo sabe a caramelo Textura dura no empalaga	no empalaga no sabe a dulce de leche gusta textura es el mejor muy rico muy duro Se sienten grumos Gelatinosa Bastante dulzor Sabe a plástico es muy sintético Es la menos espesa y es caramelosa sabor raro buena consistencia es más cremoso	Parece manjar blanco Espeso y pastoso buena textura Buen sabor pero duro no tiene sabor es suave textura spread empalaga Bastante dulzor Muy viscosa Consistencia dura mala consistencia sabor fuerte esencial del dulce de leche

9.5.3. Carta de comité de protección a seres humanos



Comité para la Protección de los Seres Humanos en la Investigación
CPSHI/IRB 00002053
Universidad de Puerto Rico – Recinto Universitario de Mayagüez
Decanato de Asuntos Académicos
Call Box 9000
Mayagüez, PR 00681-9000



23 de abril de 2013

Sa. Gladys del Socorro Tapie
Call Box 9000
Recinto Universitario de Mayagüez
Mayagüez, PR 00681

Estimada Sa. Tapie:

Como presidente del Comité para la Protección de los Seres Humanos en la Investigación (CPSHI), he estudiado la documentación sometida para el proyecto titulado *Utilización del suero ácido lácteo en la elaboración de un dulce de leche con probióticos* y determinado que, por limitarse la participación de los seres humanos a un estudio sensorial de opciones para la elaboración de dulce de leche y además se toman medidas para evitar que personas alérgicas participen, su proyecto está exento, bajo la cláusula 45 CFR 46.101(b)(6) de todos los requisitos de la parte 45 CFR 46. En otras palabras, no requiere de nuestra aprobación para proceder.

Agradecemos su compromiso con los más altos estándares de protección de los seres humanos en la investigación. Quedamos de usted,

Atentamente,

Rosa F. Martínez Cruzado, Ph.D.
Presidente
CPSHI/IRB
UPR - RUM

9.6. Determinación de la crioscopia en la leche y suero ácido

Tabla. 23. Medidas del punto crioscópico en suero ácido

Tiempo seg.	Punto de congelación		Promedio
0	-0.639	-0.645	-0.642
1	-0.666	-0.666	-0.666
45	-0.703	-0.707	-0.705
58	-0.708	-0.71	-0.709
103	-0.712	-0.714	-0.713
133	-0.719	-0.721	-0.72
178	-0.722	-0.723	-0.7225
198	-0.722	-0.724	-0.723
218	-0.738	-0.739	-0.7385
258	-0.747	-0.745	-0.746
288	-0.748	-0.749	-0.7485
318	-0.774	-0.775	-0.7745
348	-0.782	-0.781	-0.7815
383	-0.852	-0.8	-0.826
408	-0.836	-0.816	-0.826
453	-0.862	-0.817	-0.8395
483	-0.823	-0.826	-0.8245
508	-0.822	-0.828	-0.825
538	-0.83	-0.832	-0.831
553	-0.828	-0.831	-0.8295
568	-0.828	-0.838	-0.833
583	-0.826	-0.83	-0.828
600	-0.843	-0.835	-0.839
617	-0.829	-0.843	-0.836
632	-0.832	-0.84	-0.836
647	-0.842	-0.84	-0.841

Tabla. 24. Medidas del punto crioscópico en leche

Tiempo seg	Punto de congelación	Promedio
0	-0.529	-0.528
1	-0.533	-0.537
45	-0.539	-0.542
58	-0.545	-0.546
103	-0.548	-0.551
133	-0.557	-0.561
178	-0.567	-0.55
198	-0.574	-0.575
218	-0.579	-0.579
258	-0.583	-0.582
288	-0.587	-0.583
318	-0.607	-0.608
348	-0.624	-0.617
383	-0.638	-0.64
408	-0.639	-0.641
458	-0.667	-0.662
488	-0.665	-0.664
528	-0.67	-0.666
553	-0.672	-0.67
573	-0.672	-0.671
593	-0.674	-0.671
618	-0.681	-0.68
635	-0.681	-0.682
650	-0.683	-0.684
665	-0.687	-0.683
680	-0.686	-0.688
695	-0.687	-0.687

Tabla. 25. Tabla nutricional del dulce de leche con suero ácido con probióticos.

Nutrition Facts/Datos De Nutrición			
Serving Size /Tamaño por Ración 1 tablespoon (29.96g)			
Servings Per Container /Raciones por Envase 49			
Amount Per Serving/Cantidad por Ración			
Calories / Calorías 80		Calories from Fat / Calorías de Grasa 25	
		% Daily Value*%/Valores Diarios*	
Total Fat / Grasa Total 2.5g		4%	
Saturated Fat / Grasa Saturada 1.5g		8%	
Trans Fat / Grasa Trans 0g			
Cholesterol / Colesterol 5mg		2%	
Sodium / Sodio 45mg		2%	
Total Carbohydrate / Carbohidrato Total 14g		5%	
Dietary Fiber / Fibra Dietética 0g		0%	
Sugars / Azúcares 14g			
Protein / Proteínas <1g		2%	
Vitamin A / Vitamina A 0%		•	Vitamin C / Vitamina C 0%
Calcium / Calcio 6%		•	Iron / Hierro 0%
* Percent Daily Values are based on a 2,000 calorie diet. Your daily values may be higher or lower depending on your calorie needs:			
* Los Porcentajes de Valores Diarios están basados en una dieta de 2,000 calorías. Sus valores diarios pueden ser mayores o menores dependiendo de sus necesidades calóricas:			
	Calories/Calorías:	2,000	2,500
Total Fat/Grasa Total	Less than/Menos de	65g	80g
Saturated Fat/Grasa Saturada	Less than/Menos de	20g	25g
Cholesterol/Colesterol	Less than/Menos de	300mg	300mg
Sodium/Sodio	Less than/Menos de	2,400mg	2,400mg
Total Carbohydrate/Carbohidrato Total		300g	375g
Dietary Fiber/Fibra Dietética		25g	30g
Protein/Proteínas		50g	65g
Calories per gram/Calorías por gramo:			
Fat/Grasas 9 • Carbohydrate/Carbohidratos 4 • Protein/Proteínas 4			

Ingredients: Whey, Acid, Liquid; Milk, Whole 3.3%; Sugar, White Granulated; Butter, Unsalted; Sodium Bicarbonate; Seaweed, Agar (Agar-agar)