



# **ESTUDIO DE ESTABILIZACIÓN DE BEBIDAS LÁCTEAS ÁCIDIFICADAS ENRIQUECIDAS EN PROTEÍNAS**

**TRABAJO FIN DE MÁSTER**

**Curso: 2014/15**

**Alumno: Débora Vizcarra López  
Tutor: M<sup>a</sup> Felicidad Ronda Balbas**

**Máster en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos  
E.T.S. Ingenierías Agrarias, Campus de la Yutera (Palencia)  
Universidad de Valladolid**

## Índice

Resumen .....	3
1. Introducción .....	4
2. Objetivos.....	9
3. Materiales y métodos.....	9
3.1. Ingredientes, materiales y equipos .....	9
3.2. Elaboración de las bebidas .....	11
3.3. Diseño de los experimentos .....	12
3.4. Métodos de evaluación .....	14
3.4.1. Determinación cuantitativa del sedimento .....	14
3.4.2. Evaluación semi-cuantitativa del sedimento .....	14
3.4.3. Evaluación de la estabilidad.....	15
3.4.4. Análisis organoléptico .....	16
3.5. Análisis de datos .....	16
4. Resultados y discusión .....	17
4.1. Fase I: Estudio de estabilidad de pectinas y CMC.....	17
4.2. Fase II: Estudio de la influencia de la dosis de estabilizante, pH de aplicación y tipo de procesado .....	19
4.2.1. Estabilización con pectina .....	19
4.2.2. Estabilización con CMC .....	23
4.3. Fase III: Caracterización de la homogenización .....	25
4.3.1. Estudio del efecto de la presión de homogenización .....	25
4.3.2. Estudio del efecto de la temperatura de homogenización .....	26
5. Conclusiones .....	27
6. Agradecimientos .....	28
7. Bibliografía.....	29
8. Anexos .....	31
ANEXO I: Análisis de Datos Estadísticos .....	31

## **Resumen**

Las bebidas lácteas acidificadas necesitan estabilizantes para evitar problemas de sedimentación y prevenir la inestabilidad. En este estudio se ha evaluado la estabilización de una bebida láctea acidificada enriquecida en proteínas mediante el uso de dos tipos de estabilizantes, pectina y carboximetilcelulosa (CMC). Para este estudio se determinó la cantidad de sedimento (%) que aportaban las muestras preparadas. A partir de estos resultados experimentales se concluyó que tanto la dosis de estabilizante como el procesado influyen en el sedimento (%) y que el pH no fue un factor influyente en el sedimento (%). El mejor procesado fue el que sometía a la muestra a dos homogenizaciones. La presión y temperatura de homogenización también influyó en el sedimento (%). Presiones elevadas en la primera homogenización y presiones bajas en la segunda homogenización dieron lugar a una disminución del sedimento (%) y altas temperaturas (55 °C) en la homogenización mostraron una clara reducción del sedimento (%).

Palabras Clave: Pectina; CMC; Bebidas lácteas acidificadas; estabilización; homogenización.

## **Abstract**

Acid dairy drinks need a stabilizer to avoid sedimentation problems and to prevent instability. This study assessed the stabilization of acid dairy drinks enriched in proteins by using two types of stabilizers, pectin and carboxymethylcellulose (CMC) .In this study the amount of sediment (%) contributing samples prepared was determined. Experimental results concluded that stabilizer concentration and process influenced in sediment (%) and the pH was not an influence factor in the sediment (%). The best process was the process with two homogenizations. Pressure and temperature from these homogenizations also influenced sediment (%). High pressure in the 1st homogenization and lower pressure in the 2nd lead to a decrease of sediment (%) and high temperature (55 ° C) showed a clear reduction in sediment (%).

Keywords: pectin; CMC; Acid dairy drinks; stabilization; Homogenization

## 1. Introducción

Una bebida láctea acidificada se define como un sistema líquido de proteína acidificada con estabilidad y viscosidad similar a la leche natural (Du et al., 2009; Laurent & Boulenguer, 2003), incluye yogures líquidos y bebidas de zumo y leche, su bajo pH y baja viscosidad provocan indeseables problemas de sedimentación (Janhøj, Bom Frøst, & Ipsen, 2008; Jensen, Rolin, & Ipsen, 2010). Existen dos formas de preparar estos productos, los preparados a partir de leche inoculada con un cultivo de fermentos que convierte parte de la lactosa en ácido láctico, produciendo también otras sustancias (Gösta Bylund, 1996) y los preparados por acidificación química directa (Du et al., 2009).

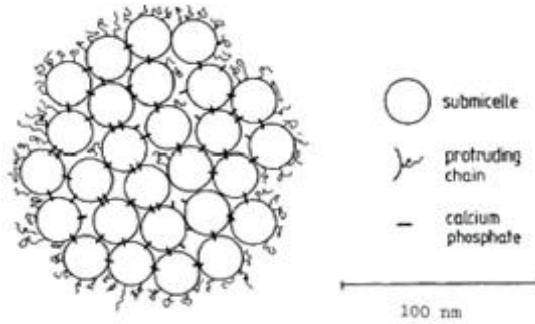
En el presente trabajo se estudiara la estabilidad de una bebida láctea enriquecida en proteína acidificada por medio de acidificación directa con ácido láctico. Este proceso es más rápido y mucho más simple que el proceso de fermentación mediante bacterias lácticas, con requerimientos industriales más complejos.

En la estabilización de las bebidas lácteas acidificadas es fundamental conocer la composición proteica de la leche, ya que, como se indica posteriormente, estos compuestos juegan un papel importante en la interacción con los estabilizantes utilizados.

Las proteínas de la leche representan el 95 % del nitrógeno que contiene la leche, las cuales se dividen en caseínas (80 %) y en proteínas del suero (20%), el restante 5% del nitrógeno total está constituido por nitrógeno no proteico (NPN). Existen cuatro tipos de caseínas,  $\alpha_{s1}$ -caseína,  $\alpha_{s2}$ -caseína,  $\beta$ -caseína y  $\kappa$ -caseína, las  $\alpha_s$  son sensibles al calcio, también existen un quinto tipo de caseína,  $\gamma$ -caseína, que están constituidas por fragmentos de  $\beta$ -caseína formados por la acción proteolítica de la plasmina (McSweeney & Fox, 2013).

Las caseínas se agregan y asocian en partículas esféricas coloidales formando estructuras que se conocen como micelas de caseína. A lo largo de los años la estructura de la micela de caseína ha sido ampliamente revisada y estudiada. Existen varios modelos postulados para su estructura, que se clasifican en tres categorías: de núcleo y corteza, de subunidades y de estructura interna (Ferrandini, Castillo, & Laencina, 2006). Uno de los modelos más ampliamente aceptado, es el modelo de Walstra y Jenness (1984) (Fig.1.), el cual considera las micelas como partículas

esféricas constituidas por submicelas de caseína, diferenciando dos tipos, las que contienen  $\alpha_s$  y  $\beta$ -caseínas, y las formadas por  $\alpha_s$  y  $\kappa$ -caseínas, estas últimas más hidrofílicas. Las submicelas se encuentran unidas por fosfato cálcico coloidal (CCP). Las  $\kappa$ -caseínas se orientan hacia el exterior de la micela, con un grupo carboxilo terminal sobresaliendo de la superficie micelar, así previene la agregación de la micela (Ferrandini et al., 2006; McSweeney & Fox, 2013).



**Figura 1.** Modelo de subunidades de la micela de caseína. Walstra y Jenness (1984) (Ferrandini et al., 2006).

Las caseínas a pH neutro (6,6) se encuentran en la leche cargadas negativamente, por lo que se repelen mutuamente, lo cual previene la precipitación. En la acidificación, las caseínas pierden su carga negativa cerca del punto isoeléctrico (4,6). Cuando el pH comienza a disminuir ocurre lo siguiente:

- Entre pH 5,8-5,5, disminuye el potencial z, lo cual lleva a las micelas a formar agregados.
- Cuando el pH se encuentra entre 5,5 y 5 se produce una reorganización de diferentes tipos de caseína en la micela por la solubilización de  $\alpha$  y  $\beta$  caseínas. Las micelas se asocian formando numerosas hebras y dejan de formar estructuras esféricas.
- Cuando el pH es menor de 5 el calcio es completamente soluble y las micelas de caseína se agregan de forma irreversible formando una red tridimensional.

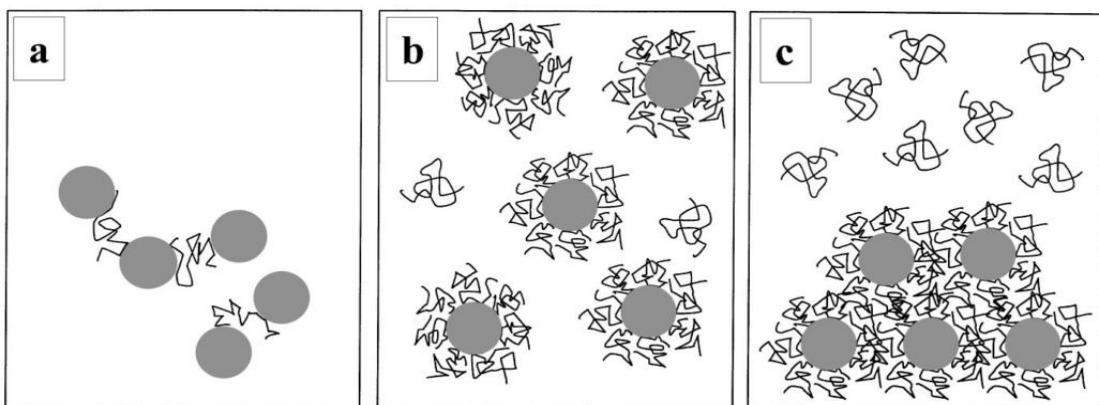
En el procesado de estas bebidas, las propiedades físicas de la red proteica se modifican:

- El tratamiento térmico contribuye a la agregación de las micelas de caseína
- La homogenización destruye la red proteica dando lugar a fragmentos de proteína

Bajo estas condiciones en la etapa de dilución en la matriz láctea, se produce la sedimentación de sólidos, que se puede prevenir con la adición de un polímero

(Laurent & Boulenguer, 2003). Los polímeros usados para evitar esta sedimentación se denominan estabilizantes.

El mecanismo de estabilización (Fig. 2.) se explica en base a la “*teoría de adsorción de polímeros*”. Según este modelo, el polímero se adsorbe a la superficie de las partículas de caseína formando una capa gruesa de proteína-polímero. La estabilidad se consigue cuando el grosor y la densidad de la capa de polímero es suficiente para mantener las partículas de caseína a una distancia que evite la atracción por fuerzas de van der Waals. El polímero expresa su capacidad de estabilización evitando la agregación de las partículas de caseína de modo que previene la formación de flóculos que puedan sedimentar (Syrbe, Bauer, & Klostermeyer, 1998).



**Figura 2.** Polímero adsorbido, no gelificante en una dispersión coloidal. Cuando se incrementa la concentración de polímero, el sistema sufre la siguiente transición: a) Floculación por unión de las caseínas mediante puentes formados por el polímero → b) Estabilización polimérica → c) Floculación. Los puentes de unión entre las caseínas existen a bajas concentraciones de polímero, pero hasta que la mitad de la superficie de las caseínas no se encuentre recubierta se producirá la floculación. Un exceso de polímero de adsorción provocara la presencia de polímero libre no adsorbido que puede conducir a floculación (Syrbe et al., 1998).

En el presente trabajo se han estudiado dos tipos de estabilizantes, las pectinas y carboximetilcelulosas (CMC).

Las pectinas son heteropolímeros de alto peso molecular que contienen al menos un 65 % en peso de unidades de ácido galacturónico (GalA). Se obtienen mayoritariamente a partir de la piel de cítricos y la pulpa de manzana. El grupo ácido puede estar libre o parcialmente metilado o amidado. Las pectinas comerciales se dividen en dos grupos:

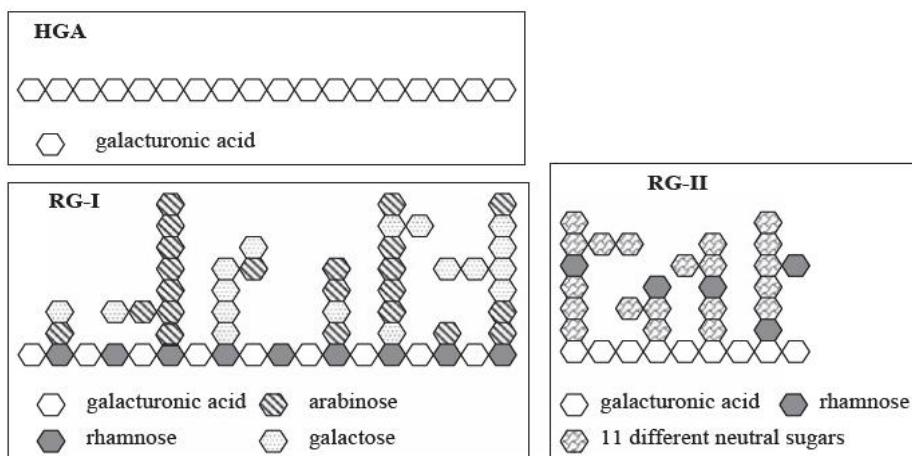
- Pectinas esterificadas de alto metoxilo (HM), con más del 50 % de esterificación.
- Pectinas esterificadas de bajo metoxilo (LM), con menos del 50 % de esterificación, que también pueden ser amidadas.

Se distinguen tres regiones en la estructura de las pectinas (Fig.3.) (Imeson, 2010):

- Homogalacturonano (HGA), un polímero lineal constituido por unidades  $\alpha$ -D-GaLA unidas por enlaces 1,4. A esta región se la denomina región lisa.

Las regiones rugosas/peludas se las denomina Ramnogalacturonano I y II (RG-I) y (RG-II).

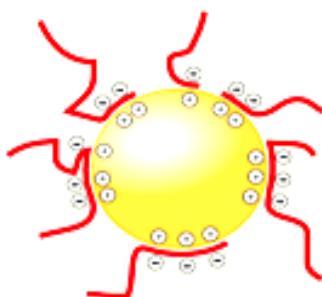
- El RG-I consiste en repeticiones del disacárido (1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-ramnosa-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -d-ácido galacturónico.
- El RG-II está compuesto por un ácido galacturónico sustituido por cadenas laterales de azúcares.



**Figura 3.** Estructura de las tres regiones principales de las pectinas, el homogalacturonano (HGA), ramnogalacturonano I (RG-I) y ramnogalacturonano II (RG-II). (Reproducida con permiso de CP Kelco) (Imeson, 2010).

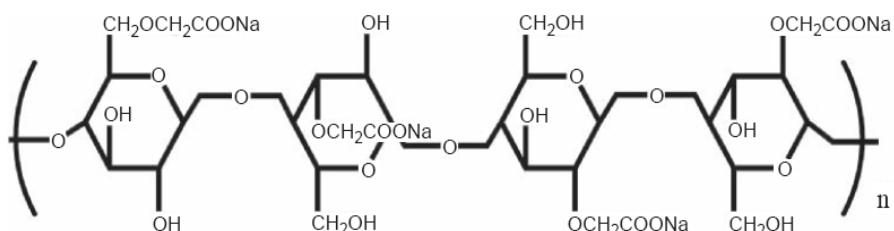
A pH 4,2-4,3, las pectinas se encuentran cargadas negativamente y se acumulan alrededor de las partículas de caseína, que están cargados positivamente (Fig.4.). Debido a la distribución específica de los grupos éster, las moléculas de pectina tienen regiones de diferente afinidad con respecto a la unión con las proteínas. Las regiones de alta afinidad (HGA) cubren la superficie de la proteína (estabilización electrostática), las regiones de menor afinidad (RG-I y RGII) se extienden fuera de la superficie en el

líquido y contribuyen a la estabilización estérica (Nakamura, Yoshida, Maeda, & Corredig, 2006).



**Figura 4.** Enlaces de pectina hacia las cargas positivas de la superficie de la proteína por puentes con grupos carboxilo libres (<http://www.herbstreith-fox.de/>).

La celulosa es un polisacárido formado por unidades repetidas de celobiosa, cada unidad está compuesta de dos unidades de anhidroglucosa (AGU) unidas por un enlace  $\beta$  [1-4]. El número de AGU se conoce como grado de polimerización. Cada AGU contiene tres grupos hidroxilo, el número de grupos hidroxilos sustituidos se conoce como grado de sustitución (DS). La CMC es un derivado de la celulosa, también se la denomina sodio carboximetil celulosa o goma celulosa. En teoría, CMC puede tener un DS máximo de 3. Comercialmente se permite un DS por encima de 1,5. Un DS por debajo de 0,4 da lugar a una CMC insoluble (Imeson, 2010).



**Figura 5.** Estructura química de CMC. Reproducida con el permiso de Hercules incorporated, filial de Ashland Inc (Imeson, 2010).

CMC se utiliza en la estabilización de bebidas proteicas de bajo pH. La naturaleza aniónica de la CMC provoca una interacción con las cargas positivas de la proteína cerca de su punto isoeléctrico. El complejo CMC-proteína formado permite la estabilización de la bebida (Imeson, 2010).

## **2. Objetivos**

El objetivo principal del presente trabajo es estudiar la estabilidad de una bebida láctea acidificada enriquecida en proteína mediante el uso de dos estabilizantes, pectinas y CMC.

Los objetivos secundarios son:

- Estudiar la influencia de diferentes pectinas y CMC del mercado en la estabilidad de las bebidas ácidas enriquecidas en proteína.
- Evaluar el efecto de diferentes parámetros del proceso de elaboración de las bebidas ácidas enriquecidas en proteínas sobre la estabilidad de la bebida, con las mejores opciones de pectina y CMC.
- Buscar la combinación óptima de estabilizante y optimizar la dosis y variables del proceso que permitan una óptima estabilización de la bebida acidificada.

## **3. Materiales y métodos**

### **3.1. Ingredientes, materiales y equipos**

Para la preparación de las bebidas acidificadas se ha utilizado una leche enriquecida en proteína: Leche Pascual Desnatada 0 % PRO (Calidad Pascual S.A.U), que está compuesta por leche desnatada, proteínas de la leche (2%) y estabilizante (E-452). Se usaron pectinas y CMC comerciales recogidas en las Tablas 1 y 2, el edulcorante utilizado fue sucralosa SPLENDA® Sucratose-DFF-1 (Tate & Lyle) y el ácido fue L-láctico PURAC® FCC 80 (Purac Bioquímica, s.a).

Se han utilizado balanzas FC6CCE-S y CP 3202 S y balanza de precisión BP 211 D (Sartorius AG) para el pesado de los ingredientes y agitadores de hélice con indicador digital RW 20 digital (IKA®-Werke GmbH & Co. KG) para la mezcla de la leche y el resto de ingredientes, un pHmetro CRISON GLP22 (Crison Instruments, S.A.) para medir el pH durante la acidificación de la bebida y un homogeneizador en dos etapas (GEA Niro Soavi SN3006L ) para la homogenización de la bebida.

**Tabla 1.** Pectinas comerciales utilizadas en el estudio

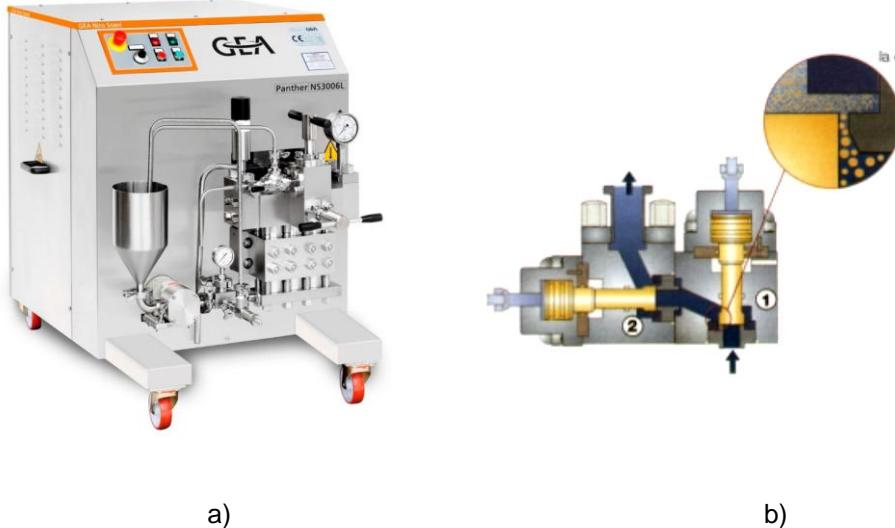
Pectina	Ref comercial	Proveedor	Características
<b>PC 1</b>	YM-115-L	CPKelco	Pectina HM
<b>PC 2</b>	LM-107-AS-YA	Premium ingredients	(datos no disponibles)
<b>PC 3</b>	30-CS-YA	Premium ingredients	(datos no disponibles)
<b>PC 4</b>	CY 025	Herbstreith & Fox	Pectina LM amidada
<b>PC 5</b>	CM 020	Herbstreith & Fox	Pectina LM amidada
<b>PC 6</b>	AYS 407c	Cargill	(datos no disponibles)
<b>PC 7</b>	AYD 3080 SB	Cargill	(datos no disponibles)
<b>PC 8</b>	XPQ-EMP4	Cargill	(datos no disponibles)
<b>PC 9</b>	CM-L	Herbstreith & Fox	Pectina LM amidada
<b>PC 10</b>	CM 203	Herbstreith & Fox	Pectina LM amidada
<b>PC 11</b>	YM 100H	Premium-CPKelco	Pectina HM
<b>PC 12</b>	YM-150-H	Premium ingredients	Pectina HM
<b>PC 13</b>	YM-100-H	Premium Ingredints	Pectina HM
<b>PC 14</b>	AcidMilkPectin	Cargill	Pectina Cítrica HM
<b>PC 15</b>	AMP 285	Cargill	(datos no disponibles)
<b>PC 16</b>	AYD 10	Cargill	(datos no disponibles)

**Tabla 2.** CMC comerciales utilizadas en el estudio

CMC	Ref comercial	Proveedor	Características
<b>CMC 1</b>	APH-B [N]. kelcogel	CPkelco	CMC + goma gelana
<b>CMC 2</b>	7LF/32262 (FMC9)	Blanose	(datos no disponibles)
<b>CMC 3</b>	CMC G	CONDIO	(datos no disponibles)
<b>CMC 4</b>	HND	Cekol	(datos no disponibles)
<b>CMC 5</b>	3668547	LP CMG	(datos no disponibles)

La homogenización, que habitualmente se realiza para conseguir una distribución uniforme de la grasa, también se usa en productos desnatados, como es el caso de este estudio, para conseguir complejos de proteína-estabilizante más pequeños y una dispersión homogénea en la leche.

La Fig. 6. muestra la imagen del homogeneizador utilizado. El equipo disponía de una bomba de alta presión que eleva la presión de la leche desde la entrada (0,8-2,2 bar) hasta la presión de homogenización ( $150\pm20$  bar).



**Figura 6.** a) Homogeneizador GEA Niro Soavi SN3006L.

(<http://www.directindustry.com/>), b) Cabezal de homogenización en dos etapas: 1) Primera etapa 2) Segunda etapa (Gösta Bylund, 1996).

En este estudio se ha trabajado con un homogeneizador en dos etapas, para aumentar la eficacia de la homogenización. En la primera etapa, la homogenización se realiza a un 75 % de la presión total, y en la segunda a un 25 % (Gösta Bylund, 1996).

Para el precalentamiento, pasteurización y enfriamiento de las bebidas se han utilizado baños termostáticos Precisterm y Digit-cool (JP SELECTA S.A.). Para la evaluación del sedimento (%) de las bebidas se ha utilizado la centrifuga 5804 R (Eppendorf AG).

También se ha utilizado material diverso de laboratorio: vasos de acero inoxidable de 1 L, vasos de precipitados, cucharillas, pipeta Pasteur, tubos Falcón para centrifuga, gradilla, botellas Pirex de 1 L, botellas PET de 300 ml.

### 3.2. Elaboración de las bebidas

Las bebidas han sido elaboradas en planta piloto. Para su preparación se utilizó como ingrediente principal leche desnatada enriquecida en proteínas (4,8 %) de origen lácteo enriquecidas en calcio, ácido láctico, edulcorante y un estabilizante. Como estabilizantes se utilizaron diferentes pectinas y carboximetilcelulosas comerciales.

Se siguieron los siguientes pasos para el procesado estándar de las bebidas. Los ingredientes (a excepción del ácido láctico) de las muestras fueron mezclados en vasos de acero inoxidable de 1 L. Para conseguir una buena homogenización se usaron agitadores de hélice con indicador digital. La acidificación de la muestra se realizó añadiendo ácido láctico con pipeta Pasteur y midiendo el pH de la muestra con pHmetro de manera continua hasta llegar al pH deseado. Una vez preparada la muestra, esta fue precalentada a 50-60 °C en baño de agua. La homogenización de la muestra se realizó en un homogeneizador de dos fases, a presión 150 ± 20 bares, tras la homogenización se envasó en botellas Pirex de 1 L. El tratamiento térmico de pasteurización se realizó en un baño a 95°C. Finalmente las muestras se envasan a temperatura ambiente, se envasaron en botellas de 330 ml de plástico PET en campana de flujo laminar.

### **3.3. Diseño de los experimentos**

En una primera fase se ha evaluado la estabilidad de las pectinas y CMC a dosis y pH de aplicación recomendado por el fabricante.

Para conocer en más profundidad la mejor pectina y la mejor CMC, en la segunda fase se ha estudiado el efecto de diferentes factores de influencia en la estabilidad de las muestras. Algunos relacionados con la formulación de la bebida, y concretamente con la acción del estabilizante utilizado: -tipo de estabilizante, dosis de utilización y pH de aplicación-, y otros con el propio proceso aplicado al producto, número de homogenizaciones y su ubicación en el proceso.

- Tipo de estabilizante: Pectina y CMC
- Dosis de utilización de estabilizante (g/100 g bebida):
  - Pectina: 0,60 % (D1), 0,65 % (D2), 0,70 % (D3), 0,75 % (D4).
  - CMC: 0,60 % (d1), 0,70 % (d2), 0,80 % (d3).
- pH de aplicación:
  - Pectinas: 4,05 (1), 4,15 (2), 4,25 (3)
  - CMC: 4,25 (A), 4,35 (B)

Para evaluar el efecto del tipo de procesado, para ambos estabilizantes, se diseñaron 4 procesos diferentes a partir del proceso estándar, donde se cambió el número de homogenizaciones (1 ó 2) a 150 ± 20 bares y a 50-60 °C y su ubicación dentro del proceso, cuyo esquema se muestra en la Tabla 3.

- Proceso 1(estándar): la homogenización se realizó después de acidificar.
- Proceso 2: la homogenización se realizó antes de acidificar.
- Proceso 3: Se realizaron dos homogenizaciones, antes y después de acidificar.
- Proceso 4: Se realizaron dos homogenizaciones, antes y después de pasteurizar.

**Tabla 3.** Etapas de elaboración de las muestras para cada uno de los 4 procesos evaluados.

<b>Etapas</b>	<b>Proceso 1</b>	<b>Proceso 2</b>	<b>Proceso 3</b>	<b>Proceso 4</b>
1	Mezclado	Mezclado	Mezclado	Mezclado
2	Acidificación	<b>Homogenización</b>	<b>Homogenización</b>	Acidificación
3	<b>Homogenización</b>	Acidificación	Acidificación	<b>Homogenización</b>
4	Pasteurización	Pasteurización	<b>Homogenización</b>	Pasteurización
5	Enfriamiento	Enfriamiento	Pasteurización	<b>Homogenización</b>
6	Envasado	Envasado	Enfriamiento	Enfriamiento
7			Envasado	Envasado

Se realizó el estudio de todas las combinaciones de las variables a evaluar. Para el estudio con pectinas fue un diseño factorial de 3 factores, dosis x pH x Proceso ( $4 \times 3 \times 4$ ), con un total de 48 muestras. Para el estudio con CMC, dosis x pH x Proceso ( $3 \times 2 \times 4$ ), con un total de 24 muestras.

En la tercera fase de este estudio con el objeto de profundizar en el efecto de la etapa de homogenización sobre la estabilidad de las bebidas, se realizó un estudio, tanto para bebidas estabilizadas con pectina como para bebidas estabilizadas con CMC, de los siguientes parámetros:

- Efecto de la presión de homogenización en el proceso 4.

Para este estudio se realizó un diseño de experimentos, donde se combinan la presión de la 1<sup>a</sup> homogenización (100, 150 y 200 bares) y la presión de la 2<sup>a</sup> homogenización (50, 100 y 150 bares), estas experimentaciones se realizaron todas a 55 °C, a una dosis fija (0,7% pectina y 0,65% CMC) y a un pH fijo (4,15 para pectinas y 4,35 para CMC) y están recogidas en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Diseño experimental para el estudio del efecto de la presión de homogenización en el proceso 4.

Muestra	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Presión 1ª Homogenización (bar)	100	150	200	100	150	200	100	150	200
Presión 2ª Homogenización (bar)	50	50	50	100	100	100	150	150	150

- Efecto de la temperatura de homogenización en el proceso 4: proceso en frío ( $7^{\circ}\text{C}$ ) y proceso en caliente ( $55^{\circ}\text{C}$ ) y con dosis variables de estabilizante.

Para este estudio se realizó el diseño de experimentos recogido en la Tabla 5, donde se combinan las dosis (4 diferentes) y las diferentes temperaturas de homogenización.

El pH de aplicación fue 4,15 para pectinas y 4,35 para CMC

**Tabla 5.** Diseño experimental para el estudio del efecto de la temperatura de homogenización en el proceso 4.

Muestra	1	2	3	4	5	6	7	8
Dosis (%)	0,55	0,6	0,65	0,7	0,55	0,6	0,65	0,7
Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	7	7	7	7	55	55	55	55

### 3.4. Métodos de evaluación

Las muestras han sido evaluadas por cuatro métodos. Un método objetivo que consiste en la determinación cuantitativa del sedimento, y tres métodos subjetivos, dos de ellos semi-cuantitativos que se establecieron mediante la observación del sedimento visual y de la estabilidad de las muestras. Por último se evaluaron las muestras organolépticamente.

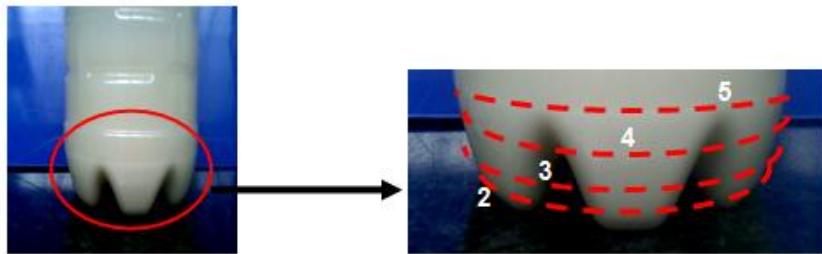
#### 3.4.1. Determinación cuantitativa del sedimento

Se realizó la determinación de sedimento mediante centrifugación. Se pesaron 45 g de muestra en un tubo Falcon de 50 ml, y se centrifugaron a 4420 rpm, 20 minutos a  $20^{\circ}\text{C}$ . El resultado se estableció a partir del volumen del sedimento expresado en porcentaje respecto al volumen inicial.

#### 3.4.2. Evaluación semi-cuantitativa del sedimento

Se realizó una comprobación visual semi-cuantitativa de la estabilidad del producto a lo largo del tiempo. Para ello, de cada muestra se guardaban dos botellas de 275 ml.

Una de las muestras se mantenía en reposo total mientras que la otra se agitaba de una a dos veces al día a lo largo del tiempo. Las muestras se almacenaban en el laboratorio a temperatura ambiente y estaban a la luz. Sobre la muestra agitada se evaluaba el sedimento de forma visual. Inclinando ligeramente la botella, se asignaba una puntuación del 1-5 en función de la cantidad de sedimento depositado en el fondo de la botella, como se observa en la Fig.7.

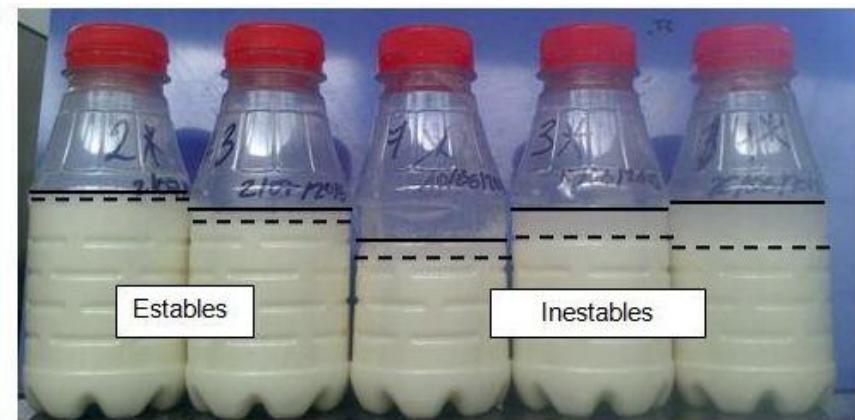


**Figura 7.** Escala para evaluar el sedimento visual. Puntuación 1: ausencia de sedimento.

La falta del establecimiento de un fondo de escala claro hizo que los resultados de esta determinación fuesen poco precisos y coherentes, por lo que no se van a presentar en esta memoria. Sin embargo sí nos ayudaron durante la realización de los ensayos a confirmar la utilidad de ciertas dosis y condiciones de experimentación, sobre todo en los ensayos preliminares.

#### 3.4.3. Evaluación de la estabilidad

La estabilidad de la bebida se establecía mediante la observación de la separación de fases alcanzada en la botella tras una semana de almacenamiento (a temperatura ambiente y expuesta a la luz) en botella y la evaluación de la altura de la capa de líquido separado. En la Fig. 8 se observan 5 muestras de bebidas lácteas acidificadas con distintos grados de estabilidad (desde la más estable, primera por la izquierda hasta la más inestable, primera por la derecha), las muestras fueron clasificadas en estables o inestables a una semana después de su preparación, como se observa en la Fig. 8.



**Figura 8.** Clasificación de muestras estables (las dos muestras de la izquierda) e inestables (las tres muestras de la derecha). La línea continua indica el nivel de volumen de la muestra y la línea discontinua indica la separación de fases de la muestra.

#### 3.4.4. Análisis organoléptico

Las muestras se evaluaron organolépticamente respecto a textura y sabor. Esta evaluación fue realizada por dos personas en el laboratorio. El objetivo era conseguir una textura fina, ligera y sin defectos apreciables en boca.

Este análisis se realizó solo para comprobar que las bebidas no presentaban texturas o sabores raros. No se realizó ningún tratamiento de los datos recogidos. Solo se pretendía descartar aquellas condiciones que conducían a productos desecharables.

### 3.5. Análisis de datos

Tras una primera clasificación con las muestras estables e inestables, se realizó un tratamiento estadístico de los datos con las muestras que fueron estables. Todos los análisis estadísticos de este trabajo se realizaron con el programa informático de estadística STATGRAPHICS Centurión XVI (StatPoint Technologies, 2009).

Se realizaron análisis de varianza (en adelante ANOVA) multivariante. El método empleado para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher.

## **4. Resultados y discusión**

Este estudio se ha dividido en tres fases, la primera fase ha consistido en el estudio de la estabilidad y organolepsia que proporcionan a las bebidas lácteas acidificadas diferentes tipos de pectinas y CMC existentes en el mercado. En la segunda fase se ha estudiado la influencia de determinados factores en la estabilidad de las bebidas estabilizadas con la mejor opción de pectina y CMC. Los tres factores fueron la dosis de estabilizante, el pH aplicado y el tipo de proceso. Por último, en la tercera fase se ha estudiado la caracterización de la etapa de homogenización dentro del proceso.

### **4.1. Fase I: Estudio de estabilidad de pectinas y CMC**

Para esta primera fase del estudio se siguieron los pasos descritos en el apartado 3 de esta memoria para la preparación de las muestras. Solo se evaluó la estabilidad de las muestras. Se evaluaron 16 pectinas y 5 CMC. Las dosis de utilización, estabilidad, sedimento visual y organolepsia de las muestras se recogen en las tablas 6 (pectinas) y 7 (CMC). Las dosis de utilización y rango de pH se seleccionaron atendiendo a las recomendaciones del fabricante. El pH aplicado en pectinas fue 4,15 y en CMC 4,25.

De las 16 pectinas diferentes, solo 2 pectinas fueron estables, la pectina 1 y la pectina 12. Se eligió la pectina 1 para la segunda fase de este trabajo ya que presentó mejor sedimento visual y mejores características organolépticas en cuanto a su sabor

En el caso de las CMC solo una de las muestras fue estable, la CMC 1.

**Tabla 6.** Dosis de uso y evaluación de las muestras estabilizadas con pectinas (PC).

Pectina	Dosis usada (%)	Estabilidad	Sedimento Visual	Organoléptico
<b>PC 1</b>	0,7	Si	1	Sabor adecuado y textura arenosa
<b>PC 2</b>	0,7	No	*	*
<b>PC 3</b>	0,7	No	*	*
<b>PC 4</b>	0,7	No	*	*
<b>PC 5</b>	0,7	No	*	*
<b>PC 6</b>	0,7	No	*	*
<b>PC 7</b>	0,7	No	*	*
<b>PC 8</b>	0,7	No	*	*
<b>PC 9</b>	0,7	No	*	*
<b>PC 10</b>	0,7	No	*	*
<b>PC 11</b>	0,7	No	*	*
<b>PC 12</b>	0,7	Si	2	Sabor anómalo y textura ligera
<b>PC 13</b>	0,7	No	*	*
<b>PC 14</b>	0,7	No	*	*
<b>PC 15</b>	0,7	No	*	*
<b>PC 16</b>	0,7	No	*	*

\*Estas muestras no fueron estables para su evaluación del sedimento visual y organolepsia.

**Tabla 7.** Dosis usada y evaluación de las muestras estabilizadas con CMC

CMC	Dosis usada (%)	Estabilidad	Sedimento Visual	Organoléptico
<b>CMC 1</b>	0,7/0,9	Si/Si	2/1	Suave/Arenosa
<b>CMC 2</b>	0,05/0,2/0,5	NO	*	*
<b>CMC 3</b>	0,05/0,2/0,5	NO	*	*
<b>CMC 4</b>	0,05/0,2/0,5	NO	*	*
<b>CMC 5</b>	0,05/0,2/0,5	NO	*	*

\*Estas muestras no llegaron a ser estables para evaluar el sedimento visual y la organolepsia.

#### **4.2. Fase II: Estudio de la influencia de la dosis de estabilizante, pH de aplicación y tipo de procesado**

Una vez seleccionada la mejor pectina y la única CMC estable a utilizar en el estudio, se realizaron el resto de ensayos, en los que se estudió la influencia en la estabilización de las bebidas de tres factores: dosis, pH de aplicación y tipo de proceso.

##### **4.2.1. Estabilización con pectina**

En la Tabla 8 se recogen los resultados de estabilidad y sedimento (%) de las muestras, obtenidos para las bebidas estabilizadas con la PC 1.

**Tabla 8.** Resultados de estabilidad y sedimento (%) de cada una de las muestras estabilizadas con la PC 1.

Muestra	Dosis	pH	Proceso	Estabilidad	Sedimento (%)
1	D1	1	1	SI	22,5
2	D1	2	1	SI	23,5
3	D1	3	1	NO	21,14
4	D1	1	2	SI	31,1
5	D1	2	2	*	*
6	D1	3	2	NO	
7	D1	1	3	SI	24,4
8	D1	2	3	SI	22,2
9	D1	3	3	NO	22,2
10	D1	1	4	NO	14,9
11	D1	2	4	SI	29,9
12	D1	3	4	SI	22,2
13	D2	1	1	SI	24,4
14	D2	2	1	SI	29,65
15	D2	3	1	SI	22,2
16	D2	1	2	SI	34,4
17	D2	2	2	SI	46,7
18	D2	3	2	NO	22,2
19	D2	1	3	SI	20
20	D2	2	3	NO	17,8
21	D2	3	3	SI	33,3
22	D2	1	4	SI	22,2

23	D2	2	4	SI	22,1
24	D2	3	4	SI	21,75
25	D3	1	1	*	*
26	D3	2	1	SI	26,7
27	D3	3	1	SI	24,4
28	D3	1	2	NO	50,7
29	D3	2	2	SI	61,3
30	D3	3	2	NO	24,2
31	D3	1	3	SI	27,9
32	D3	2	3	SI	27,8
33	D3	3	3	SI	33,3
34	D3	1	4	SI	26,3
35	D3	2	4	NO	22,2
36	D3	3	4	SI	21,1
37	D4	1	1	SI	38,9
38	D4	2	1	SI	83,3
39	D4	3	1	NO	25,7
40	D4	1	2	SI	44,4
41	D4	2	2	NO	44,4
42	D4	3	2	NO	47,1
43	D4	1	3	SI	33,3
44	D4	2	3	SI	37,5
45	D4	3	3	SI	35,6
46	D4	1	4	SI	25,55
47	D4	2	4	SI	23,4
48	D4	3	4	SI	23,4

\*Muestras no realizadas.

El porcentaje de muestras estables respecto del total de muestras estabilizadas con la PC 1 fue de un 60 %.

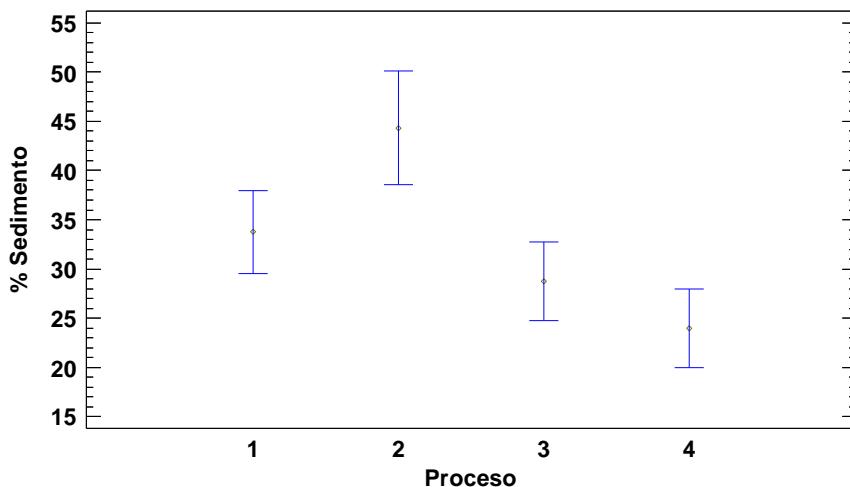
Las muestras que resultaron inestables fueron eliminadas al cabo de 1 semana. A partir de los resultados de sedimento (%) obtenidos, sólo de las muestras que fueron estables, se realizó un ANOVA de tres factores. Los resultados obtenidos para este análisis se encuentran recogidos en la Tabla 1 del Anexo I. Los p-Valores obtenidos para el factor Dosis (%) y el factor Proceso fueron en ambos casos menores a 0,05.

En el caso del factor pH, el p–Valor fue superior a 0,05, al igual que ocurrió con los p–Valores de las interacciones dobles: Dosis (%) x pH y Dosis (%) x Proceso.

Sólo los factores de Dosis (%) y Proceso ejercieron un efecto estadísticamente significativo sobre el sedimento (%) con un 95,0% de nivel de confianza. El pH del medio, dentro del intervalo estudiado, no tuvo un efecto estadísticamente significativo sobre el sedimento (%), lo que indica que los valores aplicados, que estuvieron dentro del rango recomendado por el fabricante, eran todos ellos igual de válidos. Por ello, a continuación se estudiará el efecto de la dosis y el proceso, promediando los valores obtenidos a los diferentes valores de pH.

Se realizó un ANOVA multifactorial de dos factores, dosis y proceso y su interacción doble, los resultados de p–Valor, que podemos encontrar en la Tabla 2 del ANEXO I., demostraron que la dosis, el proceso y la interacción entre estos factores es estadísticamente significativa sobre el sedimento (%) con un nivel del 95,0% de confianza. Cada proceso influye de diferente manera para cada dosis.

En la Fig. 9. se muestran las medias del sedimento (%) en cada proceso. Se observa como para los procesos 1 y 2, el sedimento (%) ha sido más elevado que para los procesos 3 y 4, esto es debido a que los proceso 1 y 2 solo tienen una homogenización.



**Figura 9.** Medias del sedimento (%) para cada proceso

Se realizó un análisis estadístico de comparación múltiple llamado Pruebas de Múltiple Rangos para cada uno de los factores estudiados (dosis y proceso), que se encuentra recogido en las Tablas 6 y 7 del ANEXO I. A partir del cual se puede determinar que

medias de sedimento (%) (Tabla 5. Anexo I) son significativamente diferentes de otras. Los resultados de este análisis se encuentran recogidos en la Tabla 9.

**Tabla 9.** Resultados de sedimento (%) para cada una de las interacciones entre dosis y proceso evaluados.

	D1	D2	D3	D4
<b>Proceso 1</b>	23 <sup>aA</sup>	25,42 <sup>aA</sup>	25,55 <sup>abA</sup>	61,1 <sup>bA</sup>
<b>Proceso 2</b>	31,1 <sup>aB</sup>	40,55 <sup>aB</sup>	61,3 <sup>abB</sup>	44,4 <sup>bB</sup>
<b>Proceso 3</b>	23,3 <sup>aAC</sup>	26,65 <sup>aAC</sup>	29,66 <sup>abAC</sup>	35,46 <sup>bAC</sup>
<b>Proceso 4</b>	26,05 <sup>aC</sup>	22,02 <sup>aC</sup>	23,7 <sup>abC</sup>	24,11 <sup>bC</sup>

Sedimento (%) con letras diferentes son significativamente diferentes de otros. Letra minúsculas indican diferencias entre las dosis y letras mayúsculas indican diferencias entre los procesos.

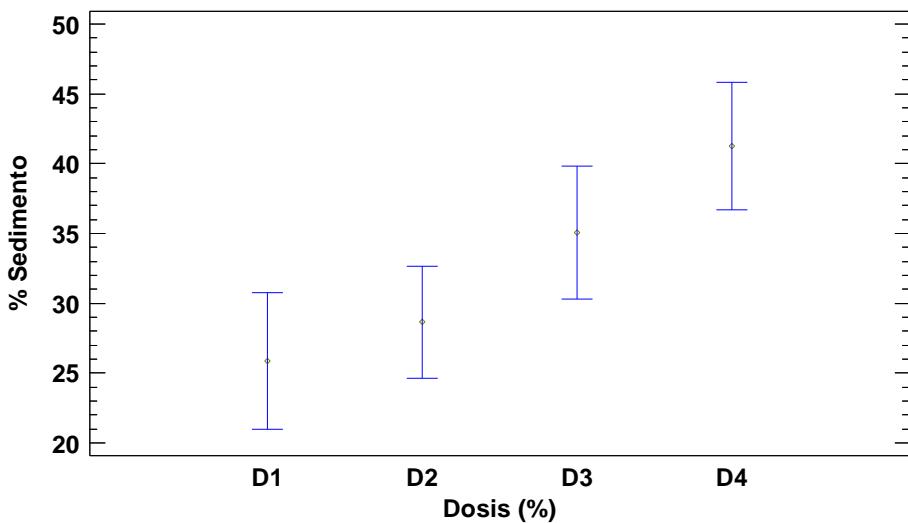
Entre los procesos 3 y 4 no existen diferencias estadísticamente significativas, pero las muestras procesadas mediante el proceso 4 presentan menor sedimento (%), lo que indica que sería un proceso más adecuado. En el proceso 4 se realizó una homogenización tras la pasteurización, esta homogenización puede ser clave para dar el acabado final a la bebida, ya que como se ha indicado en la introducción de este trabajo, el tratamiento térmico puede contribuir a la agregación de las micelas. La homogenización después de la pasteurización consigue romper las posibles agregaciones que se hayan producido.

El p-Valor del factor dosis (Tabla 2. Anexo I.) indica que existe una diferencia significativa entre las medias de sedimento (%) de una dosis y otra, con un nivel del 95,0% de confianza. En la Fig. 10. se observa que a medida que aumenta la dosis de pectina, aumenta el sedimento (%).

En cuanto a la estabilidad (%) obtenida con cada una de las dosis (Tabla 10), la dosis D3 es con la que más muestras estables se han obtenido, seguida por D4, seguida por D2 y finalmente por D1.

**Tabla 10.** Estabilidad (%) para cada una de las dosis de uso de PC

Dosis	Estable	Inestable	Total	% Estabilidad
<b>D1</b>	8	7	15	53
<b>D2</b>	14	9	23	61
<b>D3</b>	10	5	15	67
<b>D4</b>	10	6	16	63



**Figura 10.** Medias del % de Sedimento para cada dosis.

La pectina añadida a las bebidas lácteas acidificadas está compuesta por una fracción efectiva y otra no efectiva, es decir que una fracción es absorbida en las micelas de caseína y otra fracción se encuentra disuelta en el suero. El 20 % de la pectina añadida interacciona con la micela de caseína y el 80 % restante se encuentra envuelto en una red tridimensional de caseína-pectina. Esta fracción (80%) es crucial para una adsorción suficiente de pectina en el proceso de mezclado de la leche con la pectina (Tromp, de Kruif, van Eijk, & Rolin, 2004). Esto explica porque las dosis más altas de pectina son las que obtienen una mayor estabilidad del producto. Una parte de esa pectina está formando una capa que recubre el complejo proteína-pectina y otra parte se encuentra formando una red tridimensional, pero no está absorbida en la caseína. En la Fig. 8 observamos que el sedimento (%) aumentó a medida que aumentó la dosis de pectina. En base a esto, las dosis más adecuadas de pectina serían las dosis bajas, ya que producen un menor sedimento, y este aspecto es indeseable en estos productos. Pero el objetivo es obtener una bebida estable, por ello serían más adecuadas las dosis altas de pectina frente a las dosis bajas aunque el sedimento (%) sea menor.

#### 4.2.2. Estabilización con CMC

En la Tabla 14 se presentan los resultados de estabilidad y sedimento (%) para las muestras estables, obtenidos para las bebidas estabilizadas con CMC.

El porcentaje de muestras estables respecto del total de muestras estabilizadas con CMC fue tan solo de un 23 % (8 muestras estables de 24). A la vista de estos

resultados no procedió seguir realizando estudios sobre las muestras estabilizadas con CMC.

**Tabla 11.** Resultados de estabilidad y sedimento (%) obtenidos con cada una de las muestras estabilizadas con CMC.

Muestra	Dosis	pH	Proceso	Estabilidad	Sedimento (%)
1	d1	A	1	SI	26,1
2	d1	B	1	SI	23,4
3	d1	A	2	NO	33,3
4	d1	B	2	NO	35,9
5	d1	A	3	NO	26,65
6	d1	B	3	NO	26,8
7	d1	A	4	NO	17,5
8	d1	B	4	NO	17,7
9	d2	A	1	SI	40
10	d2	B	1	SI	33,9
11	d2	A	2	SI	34,4
12	d2	B	2	NO	33,2
13	d2	A	3	NO	31,5
14	d2	B	3	NO	23,1
15	d2	A	4	SI	22,2
16	d2	B	4	NO	21
17	d3	A	1	NO	41,65
18	d3	B	1	*	
19	d3	A	2	SI	41,1
20	d3	B	2	*	
21	d3	A	3	SI	38,9
22	d3	B	3	*	
23	d3	A	4	*	
24	d3	B	4	*	

\*Muestras no realizadas

### **4.3. Fase III: Caracterización de la homogenización**

La última fase del estudio se realizó para conocer con más detalle la etapa de homogenización, estudiando el efecto de la presión y de la temperatura en esta etapa. Para estos experimentos con la pectina 1 como estabilizante, se fijo una dosis (0,7 %), pH (4,15) y proceso (4) con el fin de evitar las muestras inestables.

#### **4.3.1. Estudio del efecto de la presión de homogenización**

En la Tabla 12 se recogen los resultados de sedimento (%) obtenidos con cada muestra.

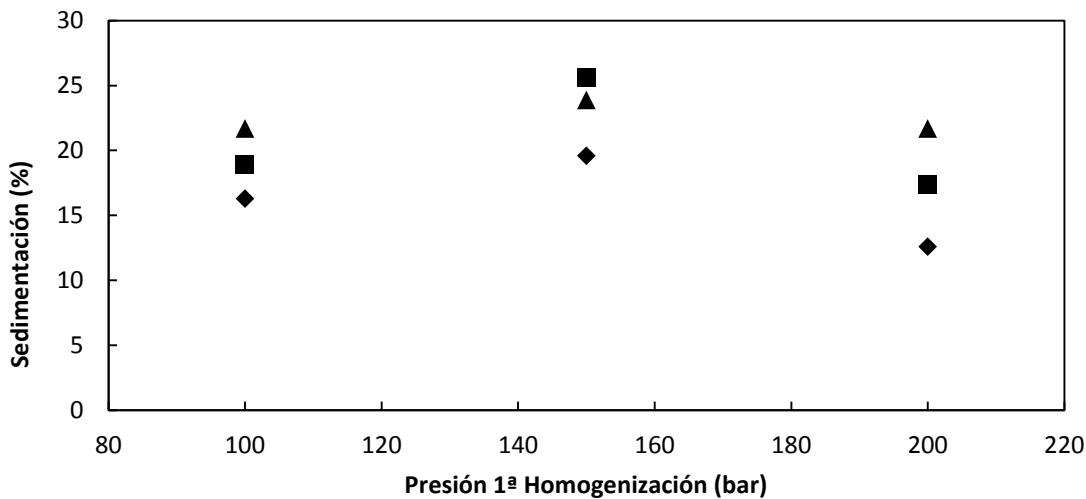
**Tabla 12.** Sedimento (%) obtenidos con las muestras estabilizadas con la pectina 1 a 55 °C.

Muestra	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Sedimento (%)	16,3	19,6	12,6	18,9	25,6	17,4	21,7	23,9	21,7

Se realizó un ANOVA Multifactorial de dos factores (presión de la 1<sup>a</sup> homogenización y presión de la 2<sup>a</sup> homogenización). Los p-Valores obtenidos demostraron que tanto la 1<sup>a</sup> homogenización como la 2<sup>a</sup> homogenización tienen un efecto estadísticamente significativo sobre el sedimento (%) con un 95,0% de nivel de confianza. Este análisis estadístico se encuentra recogido en la Tabla 3 del Anexo I.

En la Fig. 11. se observa que el sedimento (%) más bajo ha sido obtenido en la muestra tratada a una presión alta (200 bares) en la primera homogenización y a una presión baja (50 bares) en la segunda homogenización. El incremento de la presión de homogenización da lugar una disminución de la cantidad de sedimento. Una homogenización más intensa podría resultar en un incremento del número de pequeñas partículas de proteína, lo cual requeriría una cantidad mayor de pectina para cubrir todas esas pequeñas partículas (Sedlmeyer, Brack, Rademacher, & Kulozik, 2004). En este caso las bebidas han permanecido estables por lo que la dosis de 0,7 % de pectina es adecuada.

El descenso del sedimento (%) con un incremento de presión en la homogenización indica que la reacción entre las cadenas de pectina y las partículas de proteína comienza durante la homogenización. La formación de una capa de pectina sobre las partículas de caseína previene la reagregación de esas partículas, aumentando la estabilidad de la bebida láctea acidificada (Sedlmeyer et al., 2004).



**Figura 11.** Comparación de la variación del % de sedimento en función de la presión de la primera homogenización para diferentes presiones en la segunda homogenización (50 bar ◆ , 100 bar ■ , 150 bar ▲ ).

En la segunda homogenización se bajo la presión, ya que es en la primera homogenización donde va a producirse la reacción entre pectina y caseínas. Por lo tanto en la segunda homogenización las pectinas y proteínas se encuentran completamente unidas y se realiza sólo para romper posibles grandes agregados en la mezcla y para que las partículas que puedan haberse separado, a causa de las altas temperaturas en la pasteurización, se vuelvan a agregar.

**4.3.2. Estudio del efecto de la temperatura de homogenización**  
A continuación en la Tabla 13, se recogen los resultados de sedimento (%) obtenidos de los ensayos realizados para estudiar el efecto de la temperatura de homogenización.

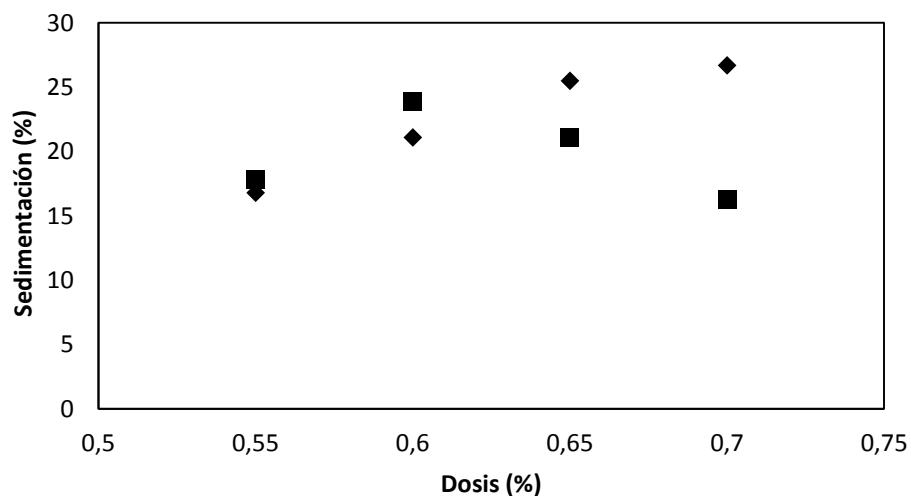
**Tabla 13.** Resultados de sedimento (%) obtenidos con dosis y temperaturas variables, a pH final 4,15 y aplicando el proceso 4 (150±20 bar).

Muestra	1	2	3	4	5	6	7	8
Sedimento (%)	16,8	21,1	25,5	26,7	16,6	23,9	21,1	16,3

Con estos resultados se realizó un ANOVA de dos factores, dosis y temperatura, cuyos resultados se encuentran recogidos en la Tabla 4 del ANEXO I. Ningún p-Valor fue menor que 0,05, ninguno de los factores tiene un efecto estadísticamente significativo sobre el sedimento (%) con un 95,0% de nivel de confianza. A pesar de

que la temperatura no tenga un efecto estadísticamente significativo, en la Fig. 12. se observa cómo a partir de una dosis de pectina de 0,6 %, a una temperatura alta (55 °C), el % de sedimento disminuye, al contrario que para una baja temperatura de 7 °C, para la cual el sedimento (%) aumenta.

Estos datos sugieren que si puede haber un efecto significativo de la temperatura pero que no existen las muestras necesarias para alcanzar la significación. La experiencia en este tipo de productos ha servido también para afirmar que la homogenización en caliente es más efectiva que en frío.



**Figura 12.** Variación de sedimento (%) a medida que aumenta la dosis de pectina para diferentes temperaturas (7 °C ◆ , 55 °C ■ ).

## 5. Conclusiones

A partir de los resultados experimentales de este estudio, se llega a las siguientes conclusiones:

- La pectina es mejor estabilizante que la CMC para este tipo de bebidas. La pectina 1 es el estabilizante más adecuado para conseguir la estabilidad de una bebida láctea acidificada con alto contenido en proteína. No todas las pectinas del mercado son validas para la estabilización.

- Los resultados estadísticos afirmaron que los valores de pH entre 4,00-4,30 no son significativos. Pero según la experiencia de este estudio, los valores de pH de 4,05 y 4,15 son más adecuados para la estabilidad de la muestra que el valor de 4,25.
- La dosis más baja (D1) aporto el sedimento (%) más bajo, pero el porcentaje de muestras estables para esa misma dosis fue muy bajo. La dosis óptima más adecuada para la estabilización sería la D3, que a pesar de obtener un alto sedimento (%), fue la dosis con mayor porcentaje de muestras estables.
- El proceso 4 (2 homogenizaciones) fue el proceso con el cual se obtuvieron menores cantidades de sedimento (%).
- En cuanto a la presión de homogenización, los mejores resultados fueron obtenidos a presiones altas en la 1<sup>a</sup> homogenización (200 bares) y presiones bajas en la 2<sup>a</sup> homogenización (50 bares).
- Existe una tendencia favorable hacia el procesado en caliente (55 °C).
- La recomendación final para estabilizar una bebida láctea acidificada enriquecida en proteína sería la siguiente:
  - Estabilizante: Pectina 1
  - Dosis: 0,7 %
  - pH: 4,05-4,15
  - Proceso 4: Presión de la 1<sup>a</sup> homogenización: 200 bar y presión 2<sup>a</sup> homogenización: 50 bar, a una temperatura de 55 °C.

## **6. Agradecimientos**

Agradezco la oportunidad que me brindo la Universidad de Valladolid y la empresa Calidad Pascual S.A.U de poder realizar este trabajo en el departamento de innovación y desarrollo de dicha empresa. Estoy muy agradecida a todos los miembros del departamento por su ayuda prestada. Especialmente a mi tutor empresarial Daniel Reñe y a José Pablo Muñoz e Ibón Alonso por toda su ayuda y enseñanza durante el desarrollo del trabajo.

## 7. Bibliografía

- Du, B., Li, J., Zhang, H., Huang, L., Chen, P., & Zhou, J. (2009). Influence of molecular weight and degree of substitution of carboxymethylcellulose on the stability of acidified milk drinks. *Food Hydrocolloids*, 23(5), 1420–1426.
- Ferrandini, E., Castillo, M., & Laencina, J. (2006). Modelos estructurales de la micela de caseína, 18, 5–18.
- Gösta Bylund, M. S. (1996). *Manual De Industrias Lácteas*. (E. A. Madrid Vicente, Ed.).
- Imeson, A. (2010). *Food Stabilisers, Thickeners and Gelling Agents*. (A. Imeson, Ed.). Blackwell Publishing Ltd.
- Janhøj, T., Bom Frøst, M., & Ipsen, R. (2008). Sensory and rheological characterization of acidified milk drinks. *Food Hydrocolloids*, 22(5), 798–806.
- Jensen, S., Rolin, C., & Ipsen, R. (2010). Stabilisation of acidified skimmed milk with HM pectin. *Food Hydrocolloids*, 24(4), 291–299.
- Laurent, M. a., & Boulenguer, P. (2003). Stabilization mechanism of acid dairy drinks (ADD) induced by pectin. *Food Hydrocolloids*, 17(4), 445–454.
- McSweeney, P. L. H., & Fox, P. F. (2013). *Advanced Dairy Chemistry. Volume 1A Proteins: Basic Aspects* (4th Editio.). Springer.
- Nakamura, A., Yoshida, R., Maeda, H., & Corredig, M. (2006). The stabilizing behaviour of soybean soluble polysaccharide and pectin in acidified milk beverages. *International Dairy Journal*, 16(4), 361–369.
- Sedlmeyer, F., Brack, M., Rademacher, B., & Kulozik, U. (2004). Effect of protein composition and homogenisation on the stability of acidified milk drinks. *International Dairy Journal*, 14(4), 331–336.
- Syrbe, A., Bauer, W. J., & Klostermeyer, H. (1998). Polymer Science Concepts in Dairy Systems — An Overview of Milk Protein and Food Hydrocolloid Interaction, 6946(98).

Tromp, R. H., de Kruif, C. G., van Eijk, M., & Rolin, C. (2004). On the mechanism of stabilisation of acidified milk drinks by pectin. *Food Hydrocolloids*, 18(4), 565–572.

Walstra P., Jenness R. (1984). Dairy Chemistry and Physics, Ed. John Wiley and Sons, New York

## 8. Anexos

### ANEXO I: Análisis de Datos Estadísticos

**Tabla 1.** Análisis de Varianza Multifactorial para % Sedimento.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
<b>EFECTOS PRINCIPALES</b>					
A: Dosis (%)	1070,54	3	356,848	4,58	<b>0,0288</b>
B:pH	148,709	2	74,3544	0,96	0,4172
C:Proceso	1015,05	3	338,349	4,35	<b>0,0333</b>
<b>INTERACCIONES</b>					
AB	223,949	6	37,3249	0,48	0,8094
AC	1451,36	9	161,262	2,07	0,1359
RESIDUOS	778,294	10	77,8294		
TOTAL (CORREGIDO)	5391,59	33			

**Tabla 2.** Análisis de Varianza Multifactorial para % Sedimento.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
<b>EFECTOS PRINCIPALES</b>					
A: Dosis (%)	1035,84	3	345,279	4,93	<b>0,0113</b>
B:Proceso	1401,32	3	467,107	6,68	<b>0,0032</b>
<b>INTERACCIONES</b>					
AB	1726,49	9	191,832	2,74	<b>0,0328</b>
RESIDUOS	1259,53	18	69,9737		
TOTAL (CORREGIDO)	5391,59	33			

**Tabla 3.** Análisis de Varianza Multifactorial para % Sedimento.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
<b>EFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:Presión 2 <sup>a</sup> Homo (bar)	62,4622	2	31,2311	9,84	<b>0,0285</b>
B:Presión 1 <sup>a</sup> Homo (bar)	53,1822	2	26,5911	8,38	<b>0,0371</b>
RESIDUOS	12,6978	4	3,17444		
TOTAL (CORREGIDO)	128,342	8			

**Tabla 4.** Análisis de Varianza Multifactorial para % Sedimento.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:Temperatura	15,125	1	15,125	0,86	0,4233
B:Dosis	42,78	3	14,26	0,81	0,5681
RESIDUOS	53,055	3	17,685		
TOTAL (CORREGIDO)	110,96	7			

**Tabla 5.** Medias por Mínimos Cuadrados para % Sedimento con intervalos de confianza del 95,0%.

Nivel	Casos	Media	Error Est.	Límite Inferior	Límite Superior
<b>Dosis (%) por Proceso</b>					
0,6 %, 1	2	23,0	5,91	10,57	35,42
0,6 %, 2	1	31,1	8,36	13,52	48,67
0,6 %, 3	2	23,3	5,91	10,87	35,72
0,6 %, 4	2	26,05	5,91	13,62	38,47
0,65 %, 1	3	25,42	4,83	15,27	35,56
0,65 %, 2	2	40,55	5,91	28,12	52,97
0,65 %, 3	2	26,65	5,91	14,22	39,07
0,65 %, 4	3	22,02	4,83	11,88	32,17
0,70 %, 1	2	25,55	5,91	13,12	37,97
0,70 %, 2	1	61,3	8,36	43,72	78,87
0,70 %, 3	3	29,66	4,83	19,52	39,81
0,70 %, 4	2	23,7	5,91	11,27	36,12
0,75 %, 1	2	61,1	5,91	48,67	73,52
0,75 %, 2	1	44,4	8,36	26,82	61,97
0,75 %, 3	3	35,46	4,83	25,32	45,61
0,75 %, 4	3	24,11	4,83	13,97	34,26

**Tabla 6.** Pruebas de Múltiple Rangos para % Sedimento por Dosis (%).

Dosis (%)	Casos	Media LS	Grupos Homogéneos
0,60 %	7	25,86	X
0,65 %	10	28,66	X
0,70 %	8	35,05	XX
0,75 %	9	41,27	X

**Tabla 7.** Pruebas de Múltiple Rangos para % Sedimento por Proceso.

Proceso	Casos	Media LS	Grupos Homogéneos
4	10	23,97	X
3	10	28,77	XX
1	9	33,76	X
2	5	44,33	X