



FACULTAD DE POSGRADOS

ELABORACIÓN DE UNA BEBIDA ALCOHÓLICA A PARTIR DE SUERO DE  
LECHE DULCE PROVENIENTE DE QUESO FRESCO Y MORA  
(*RUBUS GLAUCUS BENTH*)

Autor

Santiago Daniel Puente Moncayo

Año  
2018



FACULTAD DE POSGRADOS

ELABORACIÓN DE UNA BEBIDA ALCOHÓLICA A PARTIR DE SUERO DE  
LECHE DULCE PROVENIENTE DE QUESO FRESCO Y MORA  
(*RUBUS GLAUCUS BENTH*)

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos  
establecidos para optar por el título de Magíster en Agroindustria con  
mención calidad e inocuidad alimentaria

Profesora Guía  
Msc. Valeria Clara Almeida Streitwieser

Autor  
Santiago Daniel Puente Moncayo

Año  
2018

### **Declaración del profesor guía.**

"Declaro haber dirigido el trabajo, Elaboración de una bebida alcohólica a partir de suero de leche dulce proveniente de queso fresco y mora (*Rubus glaucus Benth*), a través de reuniones periódicas con el estudiante Santiago Daniel Puente Moncayo, en el último semestre, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

---

Valeria Clara Almeida Streitwieser

Master of Science

CC: 1709603078

### **Declaración del profesor corrector**

"Declaro haber revisado este trabajo, Elaboración de una bebida alcohólica a partir de suero de leche dulce proveniente de queso fresco y mora (*Rubus glaucus Benth*), del estudiante, Santiago Daniel Puente Moncayo, en el último semestre, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

---

Marcelo Andrés Carrasco Hott

Master in Business Administration con Mención en Negocios Internacionales

CC: 1312361254

### **Declaración del Estudiante**

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.”

---

Santiago Daniel Puente Moncayo

CC: 1716420169

## Resumen

Como resultado de la producción de queso existe una alta producción de suero de leche, que a pesar de ser considerado como un subproducto cuenta con importantes características nutricionales, sensoriales y funcionales; debido a esto y a su bajo aprovechamiento puede ser utilizado para la elaboración de bebidas comerciales.

En este estudio se busca desarrollar una bebida alcohólica tipo vino a base de suero de leche y mora, en conformidad con la normativa INEN vigente, para esto se desarrollan 9 prototipos con diferentes contenidos de ambas materias primas, y mediante un ANOVA y diferenciación de medias con un alfa del 5% se busca seleccionar aquellos prototipos a los cuales se conduce un estudio sensorial para determinar su aceptabilidad por parte de los consumidores.

Paralelamente se busca desarrollar un análisis para la determinación del contenido de metanol en este tipo de bebidas, para la cual se compara los resultados obtenidos mediante el método oficial descrita en la normativa contra los resultado obtenidos de la metodología no oficial, y mediante un análisis estadístico de ANOVA y una diferenciación de medias con un alfa al 5% determinar si existe una diferencia estadísticamente significativa.

## **Abstract**

As a result of the production of cheese there is a high production of whey which despite being considered as a by-product has important nutritional, sensorial and functional characteristics, due to this and its low utilization it can be used for the elaboration of commercial beverages.

The aim of his study is to develop a wine-type alcoholic beverage based on whey and blackberry in accordance with current INEN regulations, for this 9 prototypes are developed with different contents of both whey and blackberry, and through an ANOVA and means differentiation with an alpha of 5% it is sought to select those prototypes to which a sensory study is conducted to determine the acceptability by the consumers.

At the same time, an analysis was carried out to determine the content of methanol in this type of beverages for which the results obtained by the official method described in the regulations are compared against the results obtained from the unofficial methodology, and by a statistical analysis of ANOVA and a means differentiation with an alpha of 5% determine if there is a statistically significant difference.

# ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS .....	4
2.1 OBJETIVO GENERAL .....	4
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	5
3. HIPÓTESIS .....	5
4. MARCO TEÓRICO.....	5
4.1 SUERO DE LECHE .....	5
4.1.1 Clasificación del suero de leche.....	6
4.1.2 Propiedades del suero de leche.....	7
4.2 MORA (RUBUS GLAUCUS) .....	11
4.2.1 Tipos de mora (Rubus glaucus) que se cultivan en el Ecuador .....	12
4.2.2 Propiedades de la mora de castilla (Rubus glaucus Benth).....	12
4.3 BEBIDAS ALCOHÓLICAS .....	14
4.3.1 Proceso de Fermentación del Vino. ....	16
5. MATERIALES Y MÉTODOS .....	18
5.1 METODOLOGÍA .....	18
5.1.1 Descripción del lugar de estudio .....	18
5.1.2 Diseño Experimental y Análisis Funcional .....	18
5.1.3 Factores y niveles .....	18
5.1.4 Esquema de ANOVA.....	19
5.1.5 Variables de Respuesta .....	19
5.1.6 Manejo del experimento .....	20
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	44
7.1 CONCLUSIONES.....	44
7.2 RECOMENDACIONES.....	45
REFERENCIAS .....	46

## 1 Introducción

El Ecuador es un país agroindustrial, con una producción de leche que se estima en 5,5 millones de litros al día, de los cuales el 31% es destinada a la producción de quesos (Mipro, 2013), obteniéndose como subproducto el lactosuero. El suero de leche es considerado como el principal subproducto de la industria láctea (Bhavsagar et al., 2010), incluso es considerado como el mayor subproducto dentro de la industria de alimentos en general (Magalhães et al., 2010). La relación bajo la cual se produce el suero de leche es de 1:9, es decir que por cada kilogramo de queso elaborado se obtienen 9 litros de lactosuero (Cuellas & Wagner, 2010) (Miranda, 2007) (González-Martínez, Albors, Becerra, Carot, Cháfer, & Chiralt, 2002).

En países desarrollados y países con altísimas producción láctea, el suero es aprovechado para la producción de otro tipo de alimentos con valor agregado, dentro de los que se puede mencionar a la proteína aislada y bebidas deportivas y refrescantes principalmente, por ejemplo en EE.UU. se comercializa “Thumps up” que es una bebida a base de chocolate y suero, y en Europa “Revella” una bebida carbonatada (Hoogstraten, 1987). Sin embargo, en nuestro país este producto secundario no es aprovechado al 100%, siendo desechado casi por completo tanto en fuentes fluviales, como en desagües sin que este haya sido sometido a un tratamiento previo (Belloso-Morales y Hernández-Sánchez, 2003) (Cuellas, 2008) (González-Martínez et al., 2002) (Miranda, 2007) (Smithers, 2008). Se estima que la cantidad de leche que es destinada a la quesería en el Ecuador es aproximadamente 806 976 litros diarios (SINAGAP, 2017), lo que da como resultado alrededor de 726 278 litros de lactosuero generados de la industria quesera.

El suero de leche al ser considerado principalmente un desecho genera problemas de contaminación debido a la alta demanda biológica de oxígeno que presenta la proteína, se estima que 100L de suero contaminan los mismo que aguas servidas producidas por 450 personas en un día (Mipro, 2013),

adicionalmente, la falta de aprovechamiento del lactosuero impacta negativamente sobre las economías de los actores de la cadena agro productiva láctea. Por último, el suero al no ser aprovechado en la elaboración de otro tipo de productos de valor agregado, es utilizado como adulterante en la leche fluida (Mipro, 2013). El suero que no es desechado es utilizado principalmente en la alimentación de animales y en mínimas cantidades se lo utiliza en formulaciones de otros productos elaborados (Belloso-Morales y Hernández-Sánchez, 2003).

A pesar de ser considerado como un subproducto, el suero de leche presenta varias características nutricionales así como funcionales y sensoriales (Smithers, 2008), motivo por el cual ha ganado popularidad dentro de la industria (Beecher et al., 2008). El lactosuero contiene aproximadamente el 50% de los sólidos totales de la leche, es decir que el suero presenta alrededor de un 6 al 7% de sólidos (Chauhan et al., 2010), dentro de esta cantidad de sólidos se encuentra el total de las proteínas séricas (alfa lactoalbúmina, beta lactoglobulina, lactoferrina, inmunoglobulinas y glicomacropéptidos), representando un 20% en base seca (Anil et al., 2011), contiene casi toda la lactosa y carbohidratos de alto índice glicémico, minerales y vitaminas liposolubles e hidrosolubles (Gerder, 2007) (Atra et al., 2005; Bhavsagar et al., 2010). En cuanto a las propiedades funcionales y sensoriales del lactosuero está la generación de músculo esquelético (Millard-Stafford et al., 2005), también promueve la saciedad y ayuda a mejorar el control glicémico (Layman, 2003) (Layman & Baum, 2004), ayuda a la disminución de la presión sanguínea en personas con problemas de presión alta (Minhas y Sood, 2011) (Diary Foods, 2005), tiene efectos de prevención de cáncer y propiedades antioxidantes ayudando con enfermedades cardiovasculares (Legarová y Kourimská, 2010) (Minhas & Sood, 2011). También se sugiere que algunos compuestos bioactivos del suero de leche ayudan al sistema inmunológico (ayuda con infecciones virales y bacterianas) (Diary Foods, 2005; Minhas y Sood, 2011); promueven la disminución del colesterol sanguíneo, incrementa la secreción de serotonina y contribuye con el buen funcionamiento del hígado (Minhas y Sood

, 2011). En bebidas la principal funcionalidad del suero es su propiedad de emulsificante (Diary Foods, 2005).

Se sugiere la utilización del lactosuero para la elaboración de una bebida alcohólica fermentada debido a que varios autores enfatizan la utilización del lactosuero en la elaboración de bebidas debido a que es una opción viable, estudios de pre factibilidad elaborados sugieren que el desarrollo de una bebida es la mejor opción para la utilización de este subproducto, por su alto volumen de disponibilidad, bajos tiempos y costos de producción, gran valor nutricional y funcional (Caitlin et al., 2010; Gupta y Mathur 1989; Bhavsagar et al., 2010; Cuellas y Wagner, 2010). Además la utilización del suero en la elaboración de una bebida, por su alto nivel de aprovechamiento puede ayudar con los problemas ambientales de contaminación (Bhavsagar et al., 2010) (Cuellas y Wagner, 2010). La producción de bebidas destiladas y de alcohol a partir de suero de leche han demostrando un alto potencial de industrialización (Guimarães et al., 2012; Dragone et al., 2009; Monsalve y González, 2005).

El lactosuero por si solo en bebidas presenta una baja palatabilidad y una sensación bucal muy líquida (Legarová y Kourimská, 2010), por lo que se sugiere la utilización de frutas para la elaboración de la bebida. La utilización de la mora se debe a que su producción en el Ecuador se estima es de 1832,3 toneladas métricas mensuales a un precio promedio de \$1,36 por kg de producto (SINAGAP, 2017), esta fruta es no climatérica y contiene vitaminas y minerales, alrededor del 70% de la producción mundial de la mora es desperdiciada debido a su corta vida útil (2 a 5 días) (Villegas & Albarracín, 2016)).

La mora principalmente es comercializada como derivado de la fruta fresca, se la utiliza para la producción de mermelada, caramelos, helados, bebidas alcohólicas y no alcohólicas, entre otros. Dentro de sus características, la pepa contiene entre 6-7% de proteína, entre 11 a 18% de grasa; también contiene importante cantidad de ácidos grasos esenciales (ácido linoleico y ácido

linolénico), entre 53-63% y 15-31% respectivamente, durante la elaboración de bebidas artesanales, estos compuestos son incorporados por el tipo de procesamiento (Valencia & Guevara, 2013) (Elizarrarás, Martini, & Cansino, 2015) (Bushman, Phillips, Isbell, Ou, Crane, & Knapp, 2004); adicional la mora contiene una importante cantidad de compuestos antioxidantes (ácido ascórbico, compuestos fenólicos, antocianinas, ABTS, DPPH), que ayudan a prevenir enfermedades cardiovasculares y de degeneración celular (Pereira-Lima, Vianello, Corrêa, Da-Silva-Campos, & Galhardo-Borguini, 2014).

El presente estudio propone la elaboración de una bebida fermentada utilizando levaduras para la obtención de una bebida alcohólica tipo vino de frutas, a base de suero de leche dulce y mora, focalizando el nivel de agrado por parte del consumidor así como su aceptación. Para esto se utilizarán 9 prototipos con diferentes cantidades de estos ingredientes, las variables de respuesta a medir en el vino serán de acuerdo a la norma NTE INEN 374 (Bebidas alcohólicas. Vino de frutas. Requerimientos.), una vez seleccionado el o los prototipos que cumplan con esta normativa, es necesario conocer la aceptación de los consumidores, para lo cual se realizará un estudio sensorial de preferencia y un estudio hedónico. Paralelamente a la elaboración de la bebida, se desea comprobar si el uso de un método casero para la determinación de metanol no presenta una diferencia estadísticamente significativa con relación al método aprobado en la normativa INEN, esto se debe a que se desea buscar una alternativa para la determinación de este compuesto, debido a que los métodos actuales (HPLC, absorción atómica y espectrofotometría) son costosos.

## **2 Objetivos**

### **2.1 Objetivo General**

Elaborar una bebida alcohólica a partir de suero de leche dulce proveniente de queso fresco y mora (*Rubus glaucus* Benth).

## 2.2 Objetivos Específicos

- Formular diferentes prototipos a base de suero de leche y mora
- Validar el método de cuantificación de metanol en la bebida alcohólica de producción artesanal versus métodos certificados.
- Determinar la aceptación del producto por parte de los consumidores mediante un análisis sensorial.

## 3 Hipótesis

Ho: Los diferentes porcentajes de suero y de mora utilizados no producirán diferencia en las características físico-químicas de la bebida alcohólica fermentada elaborada.

Ha: Los diferentes porcentajes de suero y de mora utilizados producirán diferencia en las características físico-químicas de la bebida alcohólica fermentada elaborada.

Ho<sub>1</sub>: Los diferentes porcentajes de suero y de mora utilizados no producirán diferencia en la aceptabilidad por parte de los consumidores de la bebida alcohólica fermentada elaborada.

Ha<sub>1</sub>: Los diferentes porcentajes de suero y de mora utilizados producirán diferencia en la aceptabilidad por parte de los consumidores de la bebida alcohólica fermentada elaborada.

## 4 Marco teórico

### 4.1 Suero de leche

Como se mencionó en la introducción, el suero de leche es un subproducto de la industria láctea, que en su mayoría es desechado. Sin embargo, el lactosuero y en específico su proteína presenta varias características deseables, dentro de las que se encuentran propiedades nutricionales, funcionales y sensoriales, es por este motivo que tanto el suero de leche líquido como la proteína aislada y concentrada han ganado popularidad en la fabricación de bebidas así como ingrediente en la industria de alimentos

(Beecher, Drake, Foegeding, & Luck, 2008) (Minhas & Sood, 2011) (Jeličić, Božanić, & Tratnik, 2008). En el presente capítulo se hablará sobre dichas propiedades además de la clasificación del suero de leche.

#### 4.1.1 Clasificación del suero de leche

El suero de leche se clasifica en dos grupos, suero dulce y suero ácido; esta clasificación depende del contenido de ácido láctico presente. El lactosuero ácido es obtenido de los quesos elaborados mediante la acidificación de la leche o mediante la adición de bacterias lácticas para generar la ruptura de la fracción k de la caseína, mientras que el suero dulce se obtiene como subproducto de los quesos elaborados utilizando renina (enzima responsable de precipitar la caseína) para la elaboración del queso. El suero dulce puede transformarse a ácido mediante la fermentación de la lactosa presente en el mismo (Jeličić, Božanić, & Tratnik, 2008). También existe el suero de mantequilla, el cual también es dulce, sin embargo en el Ecuador la cantidad de este subproducto no es representativa, por lo cual no es mencionada dentro del presente documento. En la tabla 1 se presenta la composición de ambos tipos de lactosuero.

Tabla 1.

*Composición de suero dulce y suero ácido (g/L)*

<b>Componentes</b>	<b>Suero dulce</b>	<b>Suero ácido</b>
<b>Sólidos Totales</b>	63,0 - 70,0	63,0 - 70,0
<b>Lactosa</b>	46,0 - 52,0	44,0 - 46,0
<b>Proteína</b>	6,0 - 10,0	6,0 - 8,0
<b>Calcio</b>	0,4 - 0,6	1,2 - 1,6
<b>Fosfatos</b>	1,0 - 3,0	2,0 - 4,5

<b>Lactatos</b>	2,0	6,4
<b>Cloratos</b>	1,1	1,1

Adaptado de: (Jeličić, Božanić, & Tratnik , 2008)

#### **4.1.2 Propiedades del suero de leche**

El suero de leche cuenta con características nutricionales, funcionales y sensoriales, las mismas que difieren entre el suero de leche dulce y ácido, no lo suficiente como para considerarlos por separado con excepción de algunos puntos específicos. La principal diferencia entre el suero dulce y ácido es el contenido de sus componentes y la estabilidad térmica de las proteínas séricas. En el suero ácido el contenido de calcio, fosfatos, lactatos y ácido láctico es mayor, mientras que en el suero dulce presenta mayor cantidad de proteína (Jeličić, Božanić, & Tratnik , 2008). Con respecto a la estabilidad térmica, las proteínas séricas comienzan a precipitar a una temperatura alrededor de 60°C ( Caitlin, Etzel, & LaClair, 2010) (Caitlin, Etzel, & LaClair, 2009). La estabilidad aumenta a medida que el pH disminuye, por lo que en el suero ácido las proteínas soportan temperaturas de procesamiento UHT sin sufrir coagulación (Jeličić, Božanić, & Tratnik , 2008).

##### **4.1.2.1 Propiedades nutricionales del suero de leche**

Dentro de las características nutricionales, el lactosuero representa un 40% al 50% de los sólidos totales de la leche (Horton, 1995) (Minhas & Sood, 2011) (Beucler, Drake, & Foegeding, 2005). De esta manera el suero contiene alrededor del 6 al 7 % de sólidos totales. En la tabla 2 se resume la composición promedio del lactosuero. Con respecto a los oligoelementos del suero, contiene todas las vitaminas de la leche, sin embargo las vitaminas más importantes dentro del suero son la riboflavina, ácido fólico y cobalamina (B12), siendo esta última la de mayor presencia en lactosuero, esto debido a la actividad de las bacterias lácticas propias de su flora. (Jeličić, Božanić, & Tratnik , 2008).

Tabla 2.

*Composición promedio del lactosuero.*

<b>Compuesto</b>	<b>Composición</b>
Proteínas séricas (alfa lactoalbúmina, beta lactoglobulina, glicomacropéptidos, lactoferrina e inmunoglobulinas)	20% en base seca
Lactosa y carbohidratos de alto índice glicémico	70% del total de la leche
Minerales y vitaminas liposolubles e hidrosolubles	Entre el 70 al 90 % de la leche (7-12% en base seca)

Adaptado de (Rajoria, Chauhan, & Kumar, 2011) (Chauhan, Kumar, & Rajoria, 2010) (Anil, Avneet, Kum, & Kum, 2011) (Minhas & Sood, 2011) (Horton, 1995) (Horton, 1995) (Minhas & Sood, 2011) (Gerder, 2007) (Atra, Balint, Bekassy-Molnar, & Vatai, 2005) (Bhavsagar, Bin Awaz, & Patange, 2010) (Smithers, 2008) (Cuellas, 2008) (Jeličić, Božanić, & Tratnik, 2008).

Las proteínas séricas son consideradas de alto valor nutricional, incluso algunos autores sugieren que presenta una mayor calidad biológica que la caseína, así como otras proteínas de origen animal, incluyendo que la albumina (que por mucho tiempo fue considerado como proteína de referencia para la calidad de aminoácidos) (Jeličić, Božanić, & Tratnik, 2008). El alto valor nutricional se debe a su perfil peptídico contando con todos los aminoácidos (esenciales y no esenciales), cuya cantidad y relación es la que el cuerpo necesita para mantener la homeostasis sistémica (Diary Foods, 2005), en especial aquellos limitantes en la mayoría de alimentos (lisina, cistina y metionina) (Jeličić, Božanić, & Tratnik, 2008). Adicionalmente las proteínas del lactosuero cuentan con un valor entre 20 a 23 g/100g de proteína de aminoácidos de cadena ramificada (BCAA's: Leucina, Isoleucina y Valina) (Rajoria, Chauhan, & Kumar, 2011). Los BCAA's son los únicos aminoácidos capaces de ser metabolizados a glucosa (Layman & Baum, 2004) (Anil,

Avneet, Kum, & Kum, 2011) (Ha & Zemel, 2003) (Severin & Xia, 2005) (Tipton, Elliott, Cree, Aarsland, & Sanford, 2007).

Adicionalmente la cantidad de aminoácidos libres en el lactosuero es mayor al de la leche. El suero dulce posee alrededor de 4 veces más aminoácidos libres, mientras que el suero ácido contiene alrededor de 10 veces mas; sin embargo esta diferencia difiere dependiendo del nivel de hidrólisis de la caseína durante el proceso de producción de queso. Otra de las razones por las que las proteínas séricas son consideradas de mayor valor biológico que la caseína es su digestibilidad. Las proteína séricas son absorbidas en un 100% en el tracto intestinas mientras que la caseína únicamente se absorbe alrededor del 75% (Jeličić, Božanić, & Tratnik , 2008).

#### **4.1.2.2 Propiedades funcionales del suero de leche**

El lactosuero y sus proteínas cuentan con varias propiedades funcionales beneficiosas para el organismo. Dentro de las que se encuentran, que ayudan con el metabolismo (Millard-Stafford et al., 2005), protección muscular (Ha y Zemel, 2003) (Layman y Baum, 2004) (Severin y Xia, 2005) (Tipton et al., 2007) (Anil et al., 2011), promueven saciedad, mejora el control glicémico (Layman, 2003; Layman y Baum, 2004), ayudan con problemas de presión arterial (Diary Foods, 2005), ayuda a prevenir el cáncer (Legarová y Kourimská, 2010; Minhas y Sood , 2011), y se sugiere que algunos compuestos bioactivos del suero de leche confieren protección frente a infecciones bacterianas y virales (Minhas & Sood, 2011) (Diary Foods, 2005). También ayuda al sistema inmune, tiene un efecto benéfico sobre enfermedades cardiovasculares debido a que posee actividad antioxidante (Minhas y Sood , 2011); ayuda a bajar el colesterol, incrementan los niveles de serotonina en el cerebro, contribuyen al buen funcionamiento del hígado y disminuye la presión sanguínea en personas hipertensas (Minhas y Sood , 2011). Con respecto al sistema inmunológico, la presencia de inmunoglobulinas, glicoproteínas, lisozima y lactoperoxidasa en el suero de leche ayudan a su buen funcionamiento (Jeličić, Božanić, & Tratnik , 2008).

Las proteínas séricas ayudan a las personas y específicamente a los atletas favoreciendo el metabolismo muscular, disminuyendo los niveles de dolor (Millard-Stafford et al., 2005) y generando una síntesis muscular neta positiva, después de realizar actividades físicas (Borsheim, Aarsland, & Wolfe, 2004) debido al alto contenido de BCAA's, los cuales se atribuyen a la protección contra la pérdida de músculo estriado (Anil et al., 2011) (Ha y Zemel, 2003) (Layman & Baum, 2004) (Severin & Xia, 2005) (Tipton et al., 2007). Los aminoácidos de cadena ramificada proveen protección muscular ya que son los únicos capaces de producir glucosa, empleada como principal fuente de energía en lugar de utilizar proteína musculo-esquelética (Diary Foods, 2005) también son transferidos directamente al tejido muscular lo que previene la pérdida de músculo esquelético. Adicional a la presencia de BCAA's, el suero provee protección muscular durante el ejercicio mediante sus carbohidratos de alto índice glicémico, estos al ser utilizados como principal fuente de energía, los músculos no utilizan aminoácidos, los cuales pueden ser utilizados en la formación de tejido (Gerder, 2007). En cuanto a la síntesis neta de proteína muscular, a pesar que durante ejercicios de entrenamiento se promueve la síntesis proteica, el balance neto de la generación de músculo permanece negativo (diferencia entre síntesis muscular y descomposición proteica), esto se debe principalmente a una inadecuada ingesta de aminoácidos, la ingesta de proteínas séricas ha demostrado tener un perfil adecuado de aminoácidos (cantidad y relación de aminoácidos esenciales y no esenciales) que permite que el balance proteico permanezca positivo durante ejercicios de resistencia (Tang, Manolagos, Kujbida, Lysecki, Moore, & Phillips, 2007).

Otra de las propiedades funcionales que presentan las proteínas séricas son que mejoran el control glicémico y promueven la saciedad, (Layman, 2003) (Layman & Baum, 2004), algunos autores estudiaron el mecanismo mediante el cual las proteínas del suero de leche promueven la saciedad y encontraron que su consumo disminuye los niveles y frecuencia del hambre mediante el aumento de la concentración de dos hormonas en el plasma sanguíneo, la colecistoquinina y el péptido similar al glucagón-1 (hormonas que promueven la

saciedad), adicionalmente la proteína junto a la lactosa suprimen la secreción de la hormona encargada de la sensación del hambre (grelina) hasta 4 horas después del consumo de suero de leche (proteínas séricas y lactosa) (Bowen, Noakes, & Clifton, 2006a) (Bowen, Noakes, Trenergy, & Clifton, 2006b) (Blom, Lluch, Stafleu, Vinoy, Holst, & Schaafsma, 2006). Con respecto al control glicémico, esta relacionado al efecto que el lactosuero tiene sobre la grelina, debido a que la secreción de esta es inversa a la de la insulina (Saad, Bernaba, Hwu, Jinagouda, Fahmi, & Kogosov, 2002) (Flanagan, Evans, Monsod, Rife, Heptulla, & Tamborlane, 2003) (Cummings, Frayo, Marmonier, Aubert, & Chapelot, 2004), por lo que cuando se suprime la grelina, el páncreas aumenta la secreción de la insulina, ayudando a las personas diabéticas o con alta actividad física.

#### **4.1.2.3 Propiedades sensoriales del suero de leche**

Después de haber abordado las características nutricionales y funcionales del suero, se hablará sobre las propiedades sensoriales del lactosuero. Las proteínas del suero cuentan con varias características sensoriales deseadas dentro de la industria de alimentos y específicamente dentro de la producción de bebidas. Son altamente solubles, de alta viscosidad, emulsificantes y poseen propiedades antibacterianas, además de proporcionar palatabilidad a las bebidas y ayudar a mejorar la sensación bucal (Diary Foods, 2005) (Jeličić, Božanić, & Tratnik, 2008).

#### **4.2 Mora (*Rubus glaucus*)**

La mora es una fruta no climatérica, con una baja vida útil que presenta una estructura morfológica frágil y un alto contenido de compuestos bioactivos (Ayala, Valenzuela, & Bohórquez, 2013). Por su taxonomía la mora es una planta de la clase Angiospermae, subclase Dicotyledonea, orden Rosae, familia Rosaceae y género *Rubus*, de vegetación perenne, con porte arbustivo semirrecto, conformada por varios tallos. Con un sistema de raíces profundas, que pueden alcanzar hasta un metro dependiendo del tipo de suelo y la región de cultivo. Su inflorescencia es en racimos terminales y axiales, con frutas esféricas o elipsoidales cuyo tamaño varía entre 1,5 a 2,5 cm (Ocaña, 2012).

La mora cuando alcanza su estado de madurez disminuye su potencial comercial como fruta fresca, debido a que su calidad y precio disminuye, ocasionando una baja en la demanda. Sin embargo por las características fisicoquímicas de la fruta, aumenta su uso como ingrediente en productos elaborados, y en específico para la elaboración de bebidas fermentadas tipo vino por el aumento en el contenido de azúcares y el oscurecimiento del fruto, lo que le confiere a la bebida un color similar al del vino tinto (Villacr ez, 1985).

#### **4.2.1 Tipos de mora (*Rubus glaucus*) que se cultivan en el Ecuador**

En Ecuador la mora se cultiva a altitudes entre 1800 a 3000 metros, las principales provincias en las que esta fruta se cosecha son Tungurahua, Cotopaxi, Pichincha, Imbabura, Carchi y Bol ivar, produciendo alrededor de 12 a 14 toneladas al año (de esta variedad), siendo Tungurahua la de mayor producción, rodeando el 40% de la explotación total (Ocaña, 2012) (Villacr ez, 1985). El principal tipo de mora que se cultiva en el Ecuador es la *Rubus glaucus Benth* (mora de castilla), sin embargo existen otros tipos de cultivos entre los que se encuentran la *Rubus bogotensis* (se siembra entre 1700 a 3200 metros sobre el nivel del mar), *Rubus giganteus* (se siembra entre 2600 a 3400 metros sobre el nivel del mar), *Megalococcus* (se siembra entre 2300 a 2700 metros sobre el nivel del mar) y *Rubus nubigenus* (se siembra entre 2600 a 3100 metros sobre el nivel del mar) (Ocaña, 2012). En el presente estudio se utilizará la mora de castilla por ser la de mayor producción en el Ecuador.

#### **4.2.2 Propiedades de la mora de castilla (*Rubus glaucus Benth*)**

De igual forma que el suero de leche, la mora presenta características nutricionales y funcionales. Su caracterización se presenta en la tabla 3 y composición nutricional en la tabla 4, en donde se puede apreciar el contenido de macro y micronutrientes de esta fruta. Adicionalmente la mora contiene alrededor de 21mg/100g de vitamina C, 0,71mg/100g de vitamina E. Como se puede evidenciar en las tablas adjuntas, la mora no presenta cantidades altas de macronutrientes, es la concentración de oligoelementos que la hace atractiva para los consumidores. Sin embargo las propiedades funcionales son las de mayor importancia.

Tabla 3.

*Categorización de la mora.*

<b>Parámetro</b>	<b>Medición</b>
<b>pH</b>	2,88 ±0,01
<b>Acidez</b>	2,25 ±0,15
<b>(%Acido Máfico) % SST (°Bx)</b>	8,00 ±0,00
<b>Índice de Madurez (°Bx/%AT)</b>	3,57 ±0,25
<b>Humedad (%p/p)</b>	88,76 ±0,53
<b>Materia Seca (%p/p)</b>	11,25 ±0,53
<b>Minerales (%p/p)</b>	0,85 ±0,07

Adaptado de: (Ayala, Valenzuela, &amp; Bohórquez, 2013)

Tabla 4.

*Composición nutricional de la mora.*

<b>Factor nutricional</b>	<b>Contenido</b>	<b>Unidad</b>
<b>Grasa</b>	0,1	g
<b>Carbohidratos</b>	5,6	g
<b>Proteína</b>	0,6	g

<b>Fibra</b>	0,5	g
<b>Fósforo</b>	10	mg
<b>Calcio</b>	42	mg
<b>Hierro</b>	1,7	mg
<b>Ácido ascórbico</b>	8	mg
<b>Niacina</b>	0,3	mg
<b>Riboflavina</b>	0,05	mg
<b>Tiamina</b>	0,02	mg

Adaptado de: (INCAP Y FA, 2003)

Dentro de las propiedades funcionales, la mora contiene compuestos fenólicos, conocidos por su actividad antioxidante. Estos compuestos reducen la actividad de los radicales libres producidos durante la respiración celular y quelando iones metálicos (García , Vilorio-Matos, & Moreno-Álvarez , 2003) (Ochoa & Ayala, 2004). Estos compuestos ayudan al sistema cardiovascular, con problemas de la piel, disminución del colesterol sanguíneo (Cáceres, 2003), prevención de cáncer y trastornos neurodegenerativos (Vasco, 2009) (Mertz, Cheynier, Gunata, & Brat, 2007). Dentro de los compuestos fenólicos encontrados en la mora se encuentran los ácidos fenólicos, elagitaninos, antocianos, flavonoles. La cantidad de antocianos, flavonoles y ácido elálgico en la mora se encuentra entre 31 a 256 mg/100 g, 4 a 30 mg/100 g respectivamente, mientras que los compuestos fenólicos pueden alcanzar concentraciones hasta 3926 mg/100 g (Vasco, 2009) (Ocaña, 2012).

#### **4.3 Bebidas alcohólicas**

Las bebidas alcohólicas, dentro de la industria de alimentos, se encuentran dentro de las de mayor volumen de producción, tomando el primer lugar la cerveza y en segundo el vino de mesa (ya sea de uva o de frutas). Las bebidas

alcohólicas han sido elaboradas desde la antigüedad, sin embargo no se sabe con precisión la fecha exacta de su origen; existen evidencias de producciones alcohólicas desde hace 7000 años. Desde el inicio de su producción este tipo de bebidas eran consumidas a través de la fermentación empírica de jugos de fruta (debido a las levaduras presentes en su superficie) o destiladas (con el fin de aumentar el nivel de alcohol). Las levaduras utilizadas o presentes en el proceso de fermentación para la elaboración de bebidas alcohólicas son del género *Saccharomyces*, dentro de las que más destacan la *S. cerevisiae*, *S. uvarium*, *S. carlsbergensis*, *S. bayanus*, *S. capensis*, *S. sake*, *S. ellipsoideus*, *S. chivalperi*, *S. oviformis*, *S. italicus*, *S. vini*, entre otras (García, Quintero, & López-Munguía, 2004).

Las bebidas alcohólicas principalmente se clasifican entre bebidas destiladas, no destiladas y fortificadas. Las bebidas no destiladas son aquellas que son consumidas posterior a la fermentación alcohólica del mosto, su contenido alcohólico normalmente oscila entre 3,5% a 14% (v/v), sin embargo en algunos casos pueden llegar hasta 20%. Las bebidas destiladas son las que han sufrido un tratamiento de separación del alcohol, volátiles y otros compuestos, por lo general su contenido alcohólico está entre 35 a 55% (v/v). Mientras que las bebidas fortificadas son aquellas a las que a una bebida no destilada se le combina con una bebida destilada o etanol, generalmente contienen un 20% de grado alcohólico. El denominador común de todas las bebidas alcohólicas es que es el producto de una reacción química en la que se transforma el azúcar en alcohol y dióxido de carbono mediante la acción de microorganismos (García, Quintero, & López-Munguía, 2004) (Blouin & Peynaud, 2004).

La denominación de vino es exclusiva para definir aquel producto de la fermentación de jugo de uva, por lo que en el caso de obtener una bebida fermentada de otro tipo de fruta, esta debe llevar el prefijo de la fruta base con la cual se elaboró. Así como el vino cuenta con varias clasificaciones como vino tinto, vino blanco, vino rosado, vino de mesa, vino fortificado, vino espumante, vino joven, entre otros; las bebidas obtenidas de otras frutas

también comparten esta clasificación (García, Quintero, & López-Munguía, 2004) (Blouin & Peynaud, 2004).

#### **4.3.1 Proceso de Fermentación del Vino.**

Dentro del proceso de elaboración del vino se debe tomar en cuenta el grado de madurez de la fruta, el cual está expresado en relación al contenido de azúcares (°Brix) y cantidad de ácido tartárico (% de acidez), dependiendo del tipo de vino este parámetro cambia, para vinos blancos los °Brix deben estar entre 19,5 a 23,0 con una acidez de 0,7% como mínimo y la relación entre estos dos debe estar entre 27,9 a 33,0; mientras que para el vino tinto los °Brix deben estar entre 20,5 a 23,5 con una acidez mínima de 0,65% con una relación °Brix/acidez de 31,5 a 36,2 (García, Quintero, & López-Munguía, 2004). Estos aspectos son importantes ya que de estos dependen las características del producto final, los °Brix posterior a la fermentación contribuyen con el porcentaje de alcohol de la bebida, mientras que la acidez de la uva conferirá acidez al vino, la misma que debe estar entre 0,3 a 1,5%, considerándose como un criterio de calidad mínima el % de acidez expresada en ácido tartárico no menor a 0,65% (García, Quintero, & López-Munguía, 2004) (Blouin & Peynaud, 2004).

Para la elaboración del vino es necesario que el jugo de la fruta pase principalmente por un proceso de fermentación alcohólica, en el cual mediante la acción de las levaduras la cantidad de azúcares presentes son transformadas en alcohol y CO<sub>2</sub>, este proceso ocurre a temperaturas menores de 30°C y sin cambios bruscos de temperatura ya que estos ocasionan defectos en el producto final; normalmente la temperatura a la cual se fermenta el vino blanco y tinto son de 7°C a 16°C y 24°C a 29°C respectivamente (García, Quintero, & López-Munguía, 2004). Posterior a la fermentación alcohólica se da paso a una segunda fermentación maloláctica (esta fermentación es producida por las mismas levaduras que participan en la fermentación alcohólica), esta fermentación es deseable en caso que se desee disminuir la acidez del vino, impartir notas de sabor y mejorar la estabilidad del

producto (García, Quintero, & López-Munguía, 2004) (Blouin & Peynaud, 2004).

Para la fase de fermentación alcohólica es necesario la presencia de las levaduras, las cuales pueden ser adicionadas o propias de la flora de la fruta, esto depende de la técnica de fermentación que se utilice, generalmente en producciones de vino a gran escala se utiliza la adición de levaduras, mientras que en producciones artesanales o pequeñas se utilizan las nativas propias de la fruta y la región, independientemente de la técnica utilizada, la *S. cerevisiae* es la que predomina durante este proceso, esto se debe a que presenta una mayor resistencia a la presencia de alcohol y  $\text{SO}_2$  (compuesto agregado como biocida para el control del crecimiento de bacterias y microorganismos indeseables). Durante este proceso según lo propuesto por Gay-Lussac las levaduras transforman el azúcar en etanol y gas carbónico (Blouin & Peynaud, 2004), se debe destacar que no únicamente ocurre la producción de alcohol mediante la fermentación del azúcar, sino también se generan metabolitos secundarios (otros alcoholes, ácidos, ésteres, carboxilos), los cuales le imparten características de sabor y aroma a la bebida (Blouin & Peynaud, 2004) (García, Quintero, & López-Munguía, 2004).

Una vez que ha concluido la fermentación alcohólica, se da paso a la fermentación malo-láctica, en la cual se transforma el ácido málico en ácido láctico y dióxido de carbono, para este proceso es necesario contar con condiciones favorables de temperatura y pH (temperatura mayor a  $15^\circ\text{C}$  y pH por encima de 3.3) así como bajos niveles de  $\text{SO}_2$ , las ventajas de esta fermentación son la disminución de la acidez del vino (puede alcanzar un 33% de reducción de la acidez), impartir notas de sabor y mejorar la estabilidad microbiológica aumentando su vida útil. La metabolización del malato en lactato tradicionalmente se efectúa por bacterias lácticas homo y hetero-fermentativas así como de levaduras, dentro de los microorganismos más importantes están el *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *S.pombe*, sin embargo el control de la fermentación que se obtiene con los microorganismos es bajo, por lo que

en la actualidad su utilizan enzimas para controlar este bio-proceso (Garcia, Quintero, & López-Munguía, 2004) (Blouin & Peynaud , 2004).

## 5 Materiales y Métodos

### 5.1 Metodología

#### 5.1.1 Descripción del lugar de estudio

La producción de la bebida se la efectuará en la planta piloto de la Universidad de las Américas, mientras que la medición de las variables de respuesta se efectuara en el laboratorio de análisis de alimentos, de la misma institución.

#### 5.1.2 Diseño Experimental y Análisis Funcional

El diseño experimental bajo el cual se va a trabajar es un diseño experimental completamente al azar (DCA) con un arreglo factorial  $3^2$  con 3 repeticiones obteniéndose 9 tratamientos y 27 unidades experimentales.

Mientras que para el análisis de los datos se utilizará un análisis de varianza (ANOVA) y posteriormente se utilizara el método de diferenciación de medias Scheffé para verificar cual de las medias tiene una diferencia estadísticamente significativa para un alfa de 5%.

#### 5.1.3 Factores y niveles

Factor A: Suero de leche- 55%, 60%, 65%

Factor B: Mora- 25%, 20%, 15%.

##### 5.1.3.1 Tratamientos

Tabla 5.

*Tratamientos*

Tratamiento	Suero de leche	Mora
T1	55%	15%
T2	55%	20%
T3	55%	25%
T4	60%	15%

T5	60%	20%
T6	60%	25%
T7	65%	15%
T8	65%	20%
T9	65%	25%

#### 5.1.4 Esquema de ANOVA

Tabla 6.

*Esquema de ANOVA*

FV	G.L	SC	CM	Fc	Ft	Significancia
<b>Total</b>						
<b>Tratamientos</b>						
<b>A</b>						
<b>B</b>						
<b>A*B</b>						
<b>EE</b>						

Nota: El presente cuadro únicamente es un esquema, bajo el cual se analizarán los datos en la sección de resultados y discusión.

#### 5.1.5 Variables de Respuesta

Tabla 7

*Variables de respuesta*

Requerimiento	Unidad	Mínimo	Máximo
Alcohol, fracción volumétrica	%	5	18
Acidez volátil, como ácido acético	g/l	-	1,5
Metanol	mg/L	-	1000

## 5.1.6 Manejo del experimento

### 5.1.6.1 Preparación de los prototipos

El suero de leche a utilizar para la elaboración de la bebida será obtenido de la empresa MONTANO ubicada en la parroquia "NONO".

El procesamiento que se utiliza para la elaboración de la bebida fermentada se describe a continuación:

**Recepción de la materia prima:** El suero de leche será receptado de la producción diaria de queso fresco de la empresa MONTANO, verificando que sea manejado de igual forma como si fuera leche fluida; mientras que para la mora se verificara la calidad y buen estado de esta , y que se encuentre en un adecuado nivel de madurez.

**Lavado:** Este proceso se lo efectúa con agua clorada para eliminar suciedad y bacterias superficiales

**Selección:** La selección se la efectúa debido a que durante el proceso de recepción la verificación de la calidad de la fruta no se la puede efectuar en un 100%, durante esta fase se vuelve a verificar el estado de madurez de la fruta, que no presente golpes ni un crecimiento microbiano visible.

**Preparación del mosto:** Se prepara la mezcla a fermentar de acuerdo a los prototipos descritos en la tabla de tratamientos, se agrega azúcar hasta llegar a 20° Brix, se coloca 10% de levadura en base a la mezcla total, por último se adiciona 1g/L de fosfato de amonio como nutriente para las levaduras.

**Fermentación:** Este proceso se debe realizar en condiciones anaeróbicas para evitar procesos oxidativos que produzcan ácido acético, el líquido elaborado se deja fermentar por 15 días a 20°C hasta que cese la producción de gas.

**Filtrado:** Durante la producción de la bebida se produce una separación en dos fases, quedando los residuos de la fruta y levaduras en la parte inferior dejando el vino en la parte superior, con el fin de eliminar los residuos de la fermentación se procede a filtrar la bebida a 120 mesh.

**Envasado:** Este procedimiento se lo efectúa en botellas de vidrio, las cuales fueron previamente esterilizadas en agua a 95°C por 10 minutos.

### 5.1.6.2 Metodología para la medición de las variables de respuesta.

Las variables de respuesta serán medidas mediante metodologías oficiales descritas por el INEN.

Tabla 8.

#### *Variables de respuesta*

Requerimiento	Metodología
Alcohol, fracción volumétrica	INEN 360
Acidez volátil, como ácido acético	INEN 341
Metanol	INEN 347

#### 5.1.6.2.1 Metodología para determinación de etanol

##### **Materiales:**

- Destilador
- Picnómetro
- Probeta de 100 mL

##### **Procedimiento:**

- Destilar 80 mL.
- Una vez que se obtengan 40 mL de destilado, aforar a 80 mL con agua destilada, introducir el picnómetro, tomar el dato de la medición.
- Llene la probeta con 80 mL de agua destilada, introducir el picnómetro, tomar el dato de la medición.
- Calcular utilizando fórmula y comparar con las tablas de referencia.

$$d_{20/20} = \frac{m_3 - m_1}{m_2 - m_1}$$

$$m_2 - m_1$$

#### 5.1.6.2.2 Metodología para la determinación de acidez

##### **Reactivos:**

- Fenolftaleína.
- Hidróxido de sodio 0,1N.

**Materiales:**

- Erlenmeyer de 500 mL.
- Bureta de 10 mL, con regulación de 0,05 mL.
- Pipeta volumétrica de 25 mL.

**Procedimiento:**

- Colocar 250 mL de agua destilada en un Erlenmeyer de 500 mL, colocar 25 mL de la muestra y 5 gotas de fenolftaleína, se procede a titular con el hidróxido de sodio.

**5.1.6.2.3 Metodología para la determinación de metanol (de acuerdo con norma INEN 347)****Reactivos:**

- Permanganato de potasio.
- Ácido cromotrópico.
- Bisulfito de sodio seco.
- Ácido sulfúrico al 98%.
- Alcohol etílico
- Alcohol metílico
- Agua destilada

**Preparación de soluciones:**

- El permanganato de potasio se lo prepara colocando 3,0 g en un matraz de aforo de 100 mL, agregando 15 mL de ácido fosfórico y se añade agua destilada hasta obtener 100 mL de solución.
- Para el ácido cromotrópico se debe colocar 1,25 g de la sal de sodio del ácido cromotrópico en una probeta de 25 mL y aforar con agua destilada.
- Para la preparación de la solución patrón de metanol, se debe colocar 0,025% v/v en una solución de etanol con agua destilada al 5,5% v/v.
- La solución blanco se prepara una solución de 5,5% v/v de etanol en agua destilada.

**Materiales:**

- Destilador
- Termómetro de 0 a 100 °C
- Matraces volumétricos de 50 mL
- Probeta de 25 mL con tapa
- Pipetas volumétricas de 1 mL, 2 mL, 5 mL y 10 mL

**Preparación de la muestra:**

- Colocar la muestra en el equipo de destilación, en el matraz de recolección del destilado colocar 10 mL de agua destilada y proceder con la destilación hasta recolectar 220 mL.
- Colocar el matraz a un baño de agua a 15 °C por 20 minutos y luego añadir agua destilada hasta completar 250 mL.

**Procedimiento:**

- Colocar 2 mL de la solución de permanganato de potasio en un matraz volumétrico de 50 mL y enfriar en un baño de agua con hielo.
- Añadir 1 mL de la muestra preparada y dejar en reposo, dentro del baño helado, durante 30 min.
- Decolorar con una pequeña porción de bisulfito de sodio seco y adicionar 1 mL de la solución de ácido cromotrópico.
- Añadir 15 mL de ácido sulfúrico, lentamente y con agitación; luego, colocar en un baño de agua caliente (60 °C a 75 °C) durante 15 min; enfriar.
- Adicionar agua destilada hasta tener aproximadamente 50 mL.

**Curva de calibración:**

- Preparar las soluciones estándar colocando una serie de matraces volumétricos de 50 mL; 2,5 mL, 5 mL, 10 mL, 15 mL, 20 mL, y 25 mL de la solución de metanol al 0,025 % v/v, y completar la marca con una solución de alcohol etílico al 5,5 % v/v.
- Medir las absorbancias a 575 nm, realizando las lecturas contra el blanco (solución de alcohol etílico al 5,5 % v/v).

- Medir la absorbancia a la misma longitud de onda de la solución de patrón de metanol.

#### 5.1.6.2.4 Metodología para la determinación de metanol a validar.

Esta metodología se basa en que los éteres, esterres, aldehídos y cetonas, metanol y etanol presentan diferentes temperaturas de ebullición, por lo que se propone separar cada uno de estos fragmentos durante una destilación, controlando la temperatura a la cual se espera obtener estos compuestos, en la tabla 9 se describen las temperaturas de ebullición. Siendo los componentes más importantes el etano y metano

Tabla 9.

*Temperaturas de ebullición de los compuestos*

Compuesto	Temperatura
Éteres	35 °C
Esteres	50 °C
Aldehídos y cetonas	56 °C
Metanol	64,7 °C
Etanol	78,37 °C

#### 5.1.6.2.4.1 Protocolo

##### Materiales

- Destilador
- Termómetro de 0 a 100 °C
- Matraces volumétricos de 50 mL
- Probeta de 25 mL con tapa

##### Procedimiento

- Colocar la bebida en el destilador, fijar la temperatura a 56 °C, y recolectar el destilado en una probeta, esto se efectúa hasta que se deje de producir el destilado, con esto se obtienen los aldehídos y cetonas de la bebida.
- Para la obtención del metanol fijar la temperatura del destilador a 65°C, y recolectar el destilado en una probeta, esto se efectúa hasta que se

deje de producir el destilado.

- Para la obtención del etanol fijar la temperatura del destilador a 78,5 °C, y recolectar el destilado en una probeta, esto se efectúa hasta que se deje de producir el destilado.

### **5.1.6.3 Estudio sensorial.**

Para el análisis sensorial se va a utilizar dos etapas, la primera se conduce con el fin de determinar que prototipos son a los que se realizará la investigación para la comparación de los métodos de determinación de metanol y la validación del método casero; y la segunda etapa se realizará con dos tipos de pruebas, la primera es un estudio de preferencia y la segunda es una prueba de nivel de agrado.

#### **5.1.6.3.1 Criterio de selección de los jueces consumidores**

El estudio sensorial se realizó con 33 personas (jueces consumidores); se seleccionaron consumidores habituales de bebidas alcohólicas, en específico de vino, entre 18 a 65 años. Se seleccionaron 33 jueces ya que de esta forma el estudio se aleatoriza y balanceada al 100% y para no genera preferencia debido a los números asignados y elimina el error por la posición de las muestras; adicionalmente la bibliografía en cuanto a estudio sensorial se refiere menciona que para estudio con consumidores, con más de 30 participantes el estudio es confiable.

#### **5.1.6.3.2 Primera etapa**

Esta primera etapa se realiza con un estudio de preferencia, en el cual se presentan los prototipos a 33 consumidores frecuentes de vino y se les pide que ordenen de acuerdo a su preferencia evaluando olor y apariencia a las muestras presentadas, siendo el 1 la muestra que más prefieren y 9 la de menor preferencia, cada muestra será codificada con números aleatorios, y las mismas serán presentadas de manera aleatorizada, en la tabla 10 se presenta la codificación de cada uno de los prototipos. Para el análisis estadístico se utilizará la “prueba de Friedman” con una prueba de dos colas.

Tabla 10.

*Codificación de los prototipos.*

<b>Tratamiento</b>	<b>Código de muestra</b>
T1	508
T2	625
T3	780
T4	603
T5	434
T6	613
T7	640
T8	869
T9	308

**5.1.6.3.3 Segunda etapa****5.1.6.3.3.1 Estudio de preferencia.**

Para este estudio se utilizarán 33 consumidores frecuentes de bebidas alcohólicas, las muestras serán presentadas de forma aleatorizada y balanceada para no generar preferencia debido a los números asignados y eliminar el error por la posición de las muestras. Es necesario codificar cada uno de los prototipos a presentar, en la tabla 2 se muestran las codificaciones a usar, durante el estudio se presentará la bebida en vasos de poliestireno de 100 mL llenos hasta la mitad (50 mL) a 20 °C, para que los panelistas puedan enjuagarse la boca entre muestras se coloca un vaso con agua desmineralizada. En las tablas 11 y 12 se muestran la codificación a utilizar así como la aleatoriedad y balance de la presentación de las muestras.

Tabla 11.

*Codificación de las muestras.*

A	B	C
615	413	819

Tabla 12.

*Presentación de las muestras*

	1	2	3
A	11	11	11
B	11	11	11
C	11	11	11

La tabla 12 representa que cada una de las muestras es colocada el mismo numero de ocasiones en cada una de las posiciones utilizando todas las combinaciones posibles, para el análisis estadístico se utilizará la “prueba de Friedman” con una prueba de dos colas.

**5.1.6.3.3.2 Nivel de agrado**

De igual forma que para el estudio de preferencia se utilizarán 33 consumidores frecuentes de bebidas alcohólicas, durante el estudio se presentará la bebida en vasos de poliestireno de 100 mL llenos hasta la mitad (50 mL) a 20 °C, para que los panelistas puedan enjuagarse la boca entre muestras se coloca un vaso con agua desmineralizada.

Se utilizará una escala de 7 puntos con un nivel medio (ni gusta/ni disgusta), para el análisis de datos se utilizará estadística descriptiva y determinar cual es el nivel de agrado de la bebida.

**6 Resultados y Discusión**

En las tablas 13, 14 y 15 se presentan los resultados obtenidos de los estudios de grado alcohólico, acidez expresada en ácido acético y acidez expresada en ácido tartárico respectivamente.

Tabla 13.

*Resultados del grado alcohólico de los tratamientos*

	Tratamientos								
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9
<b>Repetición 1</b>	14,8	14,7	14,6	14,8	14,9	14,7	14,9	14,8	14,8

<b>Repetición 2</b>	14,7	14,8	14,7	14,8	14,8	14,8	14,7	14,8	14,9
<b>Repetición 3</b>	14,7	14,7	14,7	14,8	14,8	14,8	14,8	14,9	14,9
<b>Sumatoria</b>	44,2	44,2	44,0	44,4	44,5	44,3	44,4	44,5	44,6
<b>Media</b>	14,7	14,7	14,7	14,8	14,8	14,8	14,8	14,8	14,9

Tabla 14.

*Resultados de acidez expresado en ácido acético de los tratamientos*

	Tratamientos								
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9
<b>Repetición 1</b>	0,58	0,59	0,59	0,58	0,57	0,61	0,62	0,63	0,65
<b>Repetición 2</b>	0,57	0,58	0,57	0,60	0,59	0,63	0,68	0,63	0,64
<b>Repetición 3</b>	0,56	0,56	0,56	0,60	0,58	0,64	0,61	0,65	0,61
<b>Sumatoria</b>	1,71	1,73	1,72	1,78	1,74	1,88	1,91	1,91	1,90
<b>Media</b>	0,57	0,58	0,57	0,59	0,58	0,63	0,64	0,64	0,63

Tabla 15.

*Resultados de acidez expresado en ácido tartárico de los tratamientos*

	Tratamientos								
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9
<b>Repetición 1</b>	0,73	0,74	0,73	0,73	0,71	0,77	0,77	0,79	0,81
<b>Repetición 2</b>	0,71	0,73	0,71	0,73	0,73	0,78	0,81	0,79	0,80
<b>Repetición 3</b>	0,71	0,71	0,70	0,75	0,72	0,80	0,76	0,81	0,76
<b>Sumatoria</b>	2,15	2,18	2,14	2,21	2,16	2,35	2,34	2,39	2,37
<b>Media</b>	0,72	0,73	0,71	0,74	0,72	0,78	0,78	0,80	0,79

Los resultados obtenidos de las pruebas fisicoquímicas indican que en cuanto al contenido de alcohol etílico el producto elaborado cumple con la normativa INEN 374-3, ya que en esta indica que un vino de frutas debe tener un contenido mínimo de 6% de etanol en fracción volumétrica, mientras que el vino de suero y mora presenta un contenido promedio de 14,78%, con un máximo de 14,9% (T8 y T9) y un mínimo de 14,7% (T1, T2 y T3), haciendo referencia a las medias de cada tratamiento; de la misma forma, en cuanto a la

acidez total titulable expresada en ácido acético, la norma indica un valor máximo de 1,5g/L, y los prototipos cuentan con un porcentaje promedio de 0,6g/L, con un máximo de 0,64g/L (T8) y un mínimo de 0,57g/L (T1, T2 y T3) haciendo referencia a las medias de cada tratamiento, cumpliendo con los requerimientos estipulados. En cuanto al porcentaje de acidez expresado en ácido tartárico, en la tabla 15 se muestra que el mismo tiene un promedio de 0,75g/L, con un máximo de 0,80g/L (T8) y un mínimo de 0,71g/L (T3) en promedio, estas mediciones se encuentran de acuerdo a los parámetros de calidad propuestos para bebidas tipo vino (García, Quintero, & López-Munguía, 2004).

En las tablas 16, 17 y 18 se encuentran los resultados del análisis de varianza ANOVA del grado alcohólico, acidez expresada en ácido acético y acidez expresada en ácido tartárico respectivamente.

Tabla 16.

*ANOVA del grado alcohólico de los tratamientos.*

<b>FV</b>	<b>G.L</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>Fc</b>	<b>Ft</b>	<b>Significancia</b>
<b>Total</b>	26	0,16	0,01			
<b>Tratamientos</b>	8	0,09	0,01	0,69	3,71	NS
<b>A</b>	2	0,07	0,04	2,11	6,01	NS
<b>B</b>	2	0,01	0,00	0,15	6,01	NS
<b>A*B</b>	4	0,02	0,00	0,25	4,58	NS
<b>EE</b>	18	0,07	0,00			

CV= 0,41%

Tabla 17.

*ANOVA de acidez expresado en ácido acético de los tratamientos.*

<b>FV</b>	<b>G.L</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>Fc</b>	<b>Ft</b>	<b>Significancia</b>
<b>Total</b>	26	0,03	0,00			
<b>Tratamientos</b>	8	0,02	0,00	1,00	3,71	NS
<b>A</b>	2	0,02	0,01	3,33	6,01	NS
<b>B</b>	2	0,00	0,00	0,17	6,01	NS

<b>A*B</b>	4	0,00	0,00	0,25	4,58	NS
<b>EE</b>	18	0,01	0,00			

CV= 3,04%

Tabla 18.

*ANOVA de acidez expresado en ácido tartárico de los tratamientos.*

<b>FV</b>	<b>G.L</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>Fc</b>	<b>Ft</b>	<b>Significancia</b>
<b>Total</b>	26	0,03	0,00			
<b>Tratamientos</b>	8	0,03	0,00	0,66	3,71	NS
<b>A</b>	2	0,02	0,01	2,01	6,01	NS
<b>B</b>	2	0,00	0,00	0,14	6,01	NS
<b>A*B</b>	4	0,01	0,00	0,25	4,58	NS
<b>EE</b>	18	0,01	0,00			

CV= 2,26%

El análisis de varianza muestra que no existió una diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos, los diferentes porcentajes de suero y mora con los que se elaboró el vino no insidió en la producción de etanol, tampoco en el porcentaje de acidez expresado en ácido acético ni ácido tartárico.

Se obtuvo un CV de 0,41%, 3,04% y 2,26% para el ° alcohólico, acidez como ácido acético y acidez como ácido tartárico respectivamente dentro de lo permitido para un experimento en laboratorio (5%), lo que indica que los datos obtenidos son confiables (Sánchez-Otero, 2009).

Debido a que los tratamientos no presentaron una diferencia estadísticamente significativa para ninguna de las variables de respuesta, de acuerdo a lo expuesto en el numeral 5.1.7.3, se conduce un estudio sensorial de preferencia tomando en cuenta atributos de olor y apariencia con el fin de seleccionar cuales son los prototipos a los cuales se analizará el contenido de metanol tanto con el método oficial descrito en la norma INEN como con la metodología casera, en el estudio de preferencia los consumidores deben ordenar del 1 al 9 los prototipos de acuerdo a su nivel de preferencia. En la tabla 13 se presentan los resultados del análisis estadístico del estudio para la selección de los

prototipos, y en el gráfico 1 se muestran el ordenamiento de preferencia de las 9 formulaciones.

Tabla 19.

*Resultados del estudio de preferencia.*

Tratamiento	Código de muestra	Sumatoria	Moda	Frec 1	Frec 2	Frec 3	Frec 4	Frec 5	Frec 6	Frec 7	Frec 8	Frec 9
T1	508	222	8	0	0	0	3	7	4	5	10	4
T2	625	198	6	0	0	0	4	7	12	6	3	1
T3	780	73	3	9	8	16	0	0	0	0	0	0
T4	603	235	7	0	0	0	4	3	1	11	5	9
T5	434	218	4	0	0	0	11	0	3	4	7	8
T6	613	191	5	0	0	0	7	10	5	6	4	1
T7	640	223	9	0	0	0	4	6	8	1	4	10
T8	869	67	2	9	14	10	0	0	0	0	0	0
T9	308	58	1	15	11	7	0	0	0	0	0	0

Tabla 20.

*Determinación de significancia mediante la prueba de Friedman*

Muestra	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9
<b>Código</b>	508	625	780	603	434	613	640	869	308
<b>Sumatoria</b>	222	198	73	235	218	191	223	67	58
<b>Significancia</b>									
<b>T1-T2</b>	24								NS
<b>T1-T3</b>	149								NS
<b>T1-T4</b>	13								NS
<b>T1-T5</b>	4								NS
<b>T1-T6</b>	31								NS
<b>T1-T7</b>	1								NS
<b>T1-T8</b>	155								NS
<b>T1-T9</b>	164								NS
<b>T2-T3</b>	125								NS

<b>T2-T4</b>	37	NS
<b>T2-T5</b>	20	NS
<b>T2-T6</b>	7	NS
<b>T2-T7</b>	25	NS
<b>T2-T8</b>	131	NS
<b>T2-T9</b>	140	NS
<b>T3-T4</b>	162	NS
<b>T3-T5</b>	145	NS
<b>T3-T6</b>	118	NS
<b>T3-T7</b>	150	NS
<b>T3-T8</b>	6	NS
<b>T3-T9</b>	15	NS
<b>T4-T5</b>	17	NS
<b>T4-T6</b>	44	NS
<b>T4-T7</b>	12	NS
<b>T4-T8</b>	168	NS
<b>T4-T9</b>	177	NS
<b>T5-T6</b>	27	NS
<b>T5-T7</b>	5	NS
<b>T5-T8</b>	151	NS
<b>T5-T9</b>	160	NS
<b>T6-T7</b>	32	NS
<b>T6-T8</b>	124	NS
<b>T6-T9</b>	133	NS
<b>T7-T8</b>	156	NS
<b>T7-T9</b>	165	NS
<b>T8-T9</b>	9	NS
<b>Estadístico Crítico</b>	184,2585859	

Como se puede observar, no existe diferencia estadísticamente significativa entre las preferencias de las muestras debido a que la diferencia entre los tratamientos no es mayor que el estadístico crítico calculado, sin embargo

como se puede observar en la figura 1, los tratamientos con mayor preferencia por parte de los consumidores fueron T3, T8 y T9, siendo este último el de mayor preferencia.

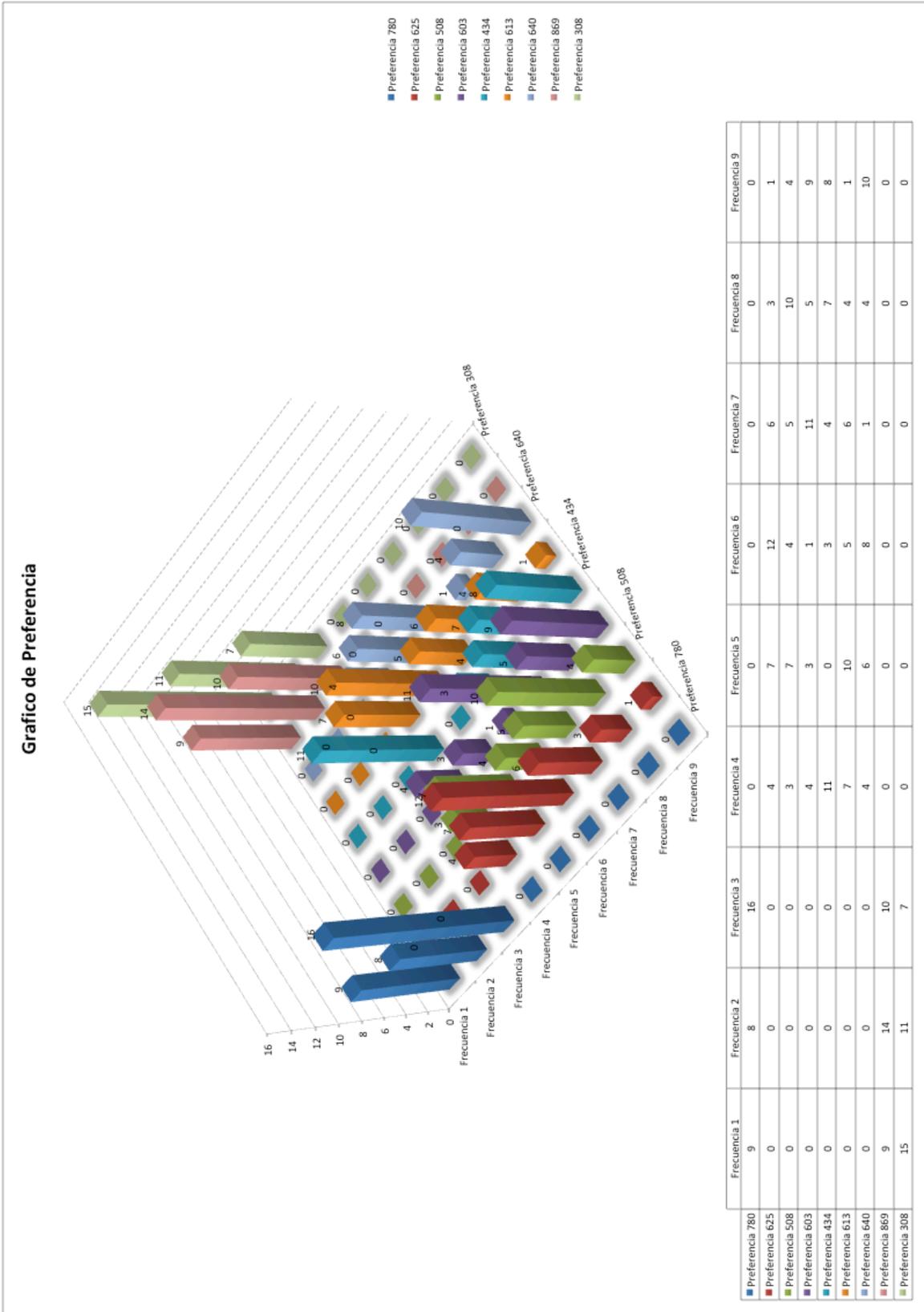


Figura 1.  
Preferencia de los prototipos.

Los prototipos que obtuvieron mayor preferencia se presentan en la tabla 21 los mismos que se presentan de menor a mayor preferencia, con estos tratamientos se realizó el estudio para la validación del método casero de determinación de metanol.

Tabla 21.

*Tratamientos seleccionados para el estudio de metanol.*

<b>Tratamiento</b>	<b>Suero de leche</b>	<b>Mora</b>
T3	55%	25%
T8	65%	20%
T9	65%	25%

En la tabla 22 se presentan los resultados obtenidos de la determinación de metanol, mediante el método casero y el método avalado en la norma INEN, la unidades de los resultados de la tabla se encuentran expresados en mg/L; en la tabla 23 se describe cada uno de los tratamientos.

Tabla 22.

*Resultados de las mediciones de metanol*

	<b>Tratamientos</b>					
	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>T4</b>	<b>T5</b>	<b>T6</b>
<b>Repetición 1</b>	0,25	0,35	0,32	0,25	0,35	0,34
<b>Repetición 2</b>	0,30	0,40	0,34	0,30	0,45	0,35
<b>Sumatoria</b>	0,55	0,75	0,66	0,55	0,80	0,69
<b>Media</b>	0,28	0,38	0,33	0,28	0,40	0,35

Tabla 23.

*Descripción de los tratamientos.*

<b>Tratamiento</b>	<b>Suero de leche</b>	<b>Mora</b>	<b>Método</b>
--------------------	-----------------------	-------------	---------------

T1	55%	25%	Casero
T2	65%	20%	Casero
T3	65%	25%	Casero
T4	55%	25%	INEN
T5	65%	20%	INEN
T6	65%	25%	INEN

En la tabla 24 se presenta el análisis de varianza ANOVA de las mediciones de metanol de los tratamientos, se observa que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre ninguno de los tratamientos ( $F_c=2,13 < F_t=5,05$ ), lo que indica que ni la diferencia en el porcentaje de mora ni de suero de leche incide en un cambio en la producción de metanol; adicionalmente al no presentar una diferencia significativa entre aquellos tratamientos cuyo contenido de metanol fue determinado mediante la norma INEN y el método casero, se puede decir que este último puede ser viable para la determinación de metanol en este tipo de bebidas fermentadas. Por último, al no existir diferencia entre las repeticiones ( $F_c=2,65 < F_t=6,61$ ) es respaldo que las determinaciones se realizaron correctamente.

Tabla 24.

*ANOVA determinación de metanol.*

<b>FV</b>	<b>G.L</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>F<sub>c</sub></b>	<b>F<sub>t</sub></b>	<b>Significancia</b>
<b>Total</b>	11	0,04	0,00			
<b>Tratamientos</b>	5	0,03	0,01	2,13	5,05	NS
<b>Repeticiones</b>	1	0,01	0,01	2,65	6,61	NS
<b>EE</b>	5	0,00	0,00			

Dado que ninguno de los prototipos presentan una diferencia estadística significativa en cuanto al contenido de etanol, acidez total ni contenido de metanol, estas tres formulaciones continúan al estudio sensorial, en la tabla 25 se muestra la codificación de cada uno de los tratamientos para el estudio tanto de preferencia como de nivel de agrado.

Tabla 25.

*Codificación de las muestras.*

<b>Tratamiento</b>	<b>Código de muestra</b>
T3	615
T8	413
T9	819

En las tablas 26 y 27 así como en la figura 2 se presentan los resultados obtenidos del estudio de preferencia, donde se muestra que el tratamiento con mayor preferencia es el 819, y el de menor preferencia es el 615.

Tabla 26.

*Resultados del nivel de preferencia.*

<b>Código de muestra</b>	<b>Sumatoria</b>	<b>Moda</b>	<b>Frecuencia 1</b>	<b>Frecuencia 2</b>	<b>Frecuencia 3</b>
615	79	3	5	10	18
413	68	2	7	17	9
819	49	1	21	8	4

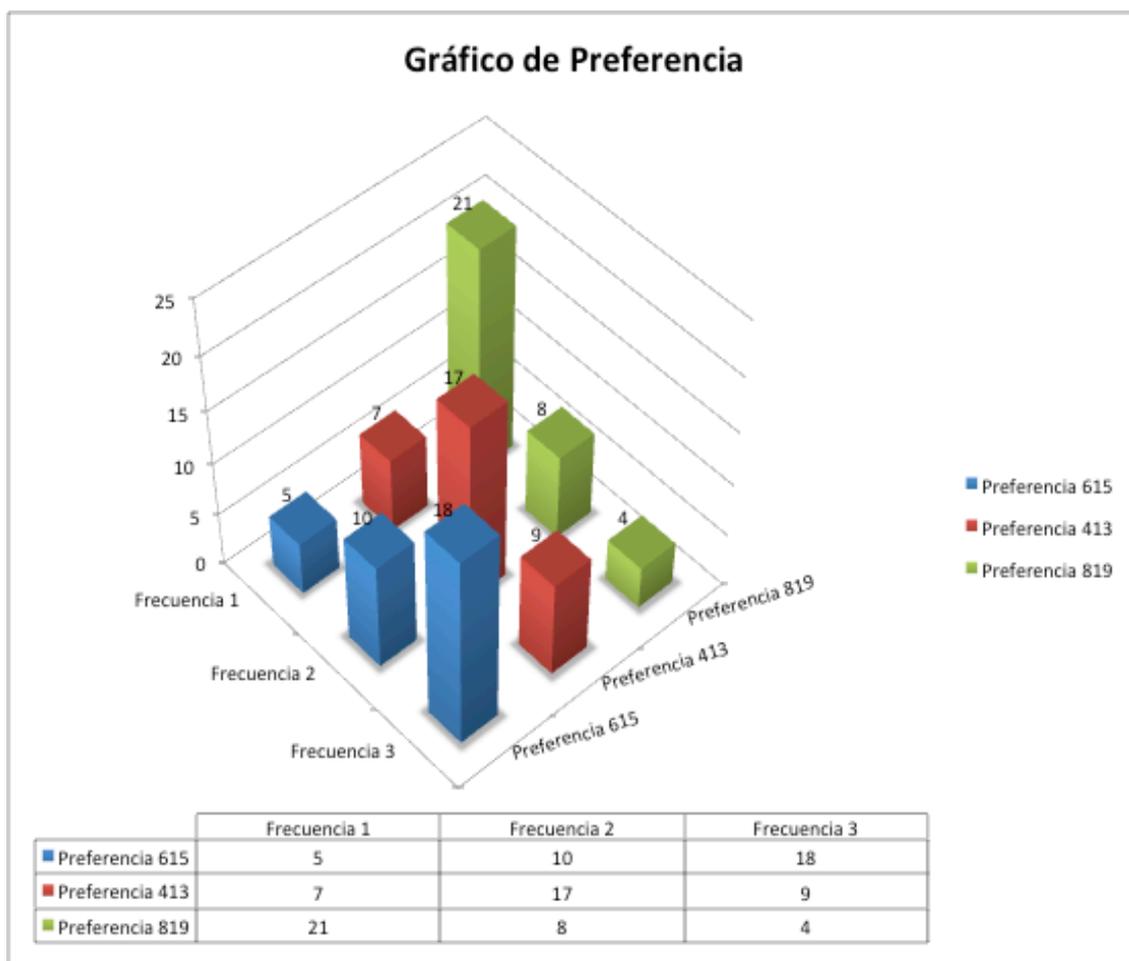
Tabla 27.

*Determinación de significancia mediante la prueba de Friedman*

<b>Muestra</b>	<b>T3</b>	<b>T8</b>	<b>T9</b>
<b>Código</b>	615	413	819
<b>Sumatoria</b>	79	68	51
<b>T3-T8</b>	11		NS
<b>T3-T9</b>	28		*
<b>T8-T9</b>	17		*
<b>Estadístico Crítico</b>	12,06		

El nivel de preferencia entre T3 y T8 no presenta una diferencia estadísticamente diferente, debido a que la diferencia entre ambos tratamientos

no es mayor al estadístico crítico ( $11 < 12,06$ ), con respecto a la preferencia de T3 y T9 se observa que la diferencia entre ambos tratamientos al ser mayor al estadístico crítico presenta una diferencia significativa, lo mismo ocurre entre los tratamientos T8 y T9 ambos son diferentes estadísticamente entre si. Sin embargo, para verificar estos datos se conducirá un estudio sensorial de nivel de agrado.



*Figura 2.*

Resultados del nivel de preferencia.

En cuanto al estudio de nivel de agrado, los resultados obtenidos son presentados en la tabla 28, en la cual se muestran los niveles de agrado para cada uno de los prototipos estudiados, mientras que en las figuras 3, 4 y 5 se muestran representados de manera gráfica.

Tabla 28.

*Nivel de agrado de los prototipos.*

	Nivel de Agrado						
	Gusta Mucho	Gusta	Gusta Poco	Ni Gusta Ni Disgusta	Disgusta Poco	Disgusta	Disgusta Mucho
<b>Muestra 615</b>							
<b>Valor Numérico Asignado</b>	7	6	5	4	3	2	1
<b>Frecuencia</b>	8	10	9	6	0	0	0
<b>Nivel de agrado Final</b>	5,61						
	Nivel de Agrado						
	Gusta Mucho	Gusta	Gusta Poco	Ni Gusta Ni Disgusta	Disgusta Poco	Disgusta	Disgusta Mucho
<b>Muestra 413</b>							
<b>Valor Numérico Asignado</b>	7	6	5	4	3	2	1
<b>Frecuencia</b>	10	12	7	4	0	0	0
<b>Nivel de agrado Final</b>	5,85						
	Nivel de Agrado						
	Gusta Mucho	Gusta	Gusta Poco	Ni Gusta Ni Disgusta	Disgusta Poco	Disgusta	Disgusta Mucho
<b>Muestra 819</b>							
<b>Valor Numérico Asignado</b>	7	6	5	4	3	2	1
<b>Frecuencia</b>	11	15	5	2	0	0	0
<b>Nivel de agrado Final</b>	6,06						

La muestra que presenta el mayor nivel de agrado el T9 (65% suero y 25% de mora) encontrándose en la opción gusta; la muestra 413 (T8=65% suero y 20% mora) presenta un nivel de agrado de 5,85 entre gusta poco y gusta estando más cercano a gusta, de igual forma la muestra 615 (T3= 55% suero y 25%

mora) presenta un nivel de agrado entre gusta poco y gusta, obteniendo un promedio de 5,61 en la escala hedónica.

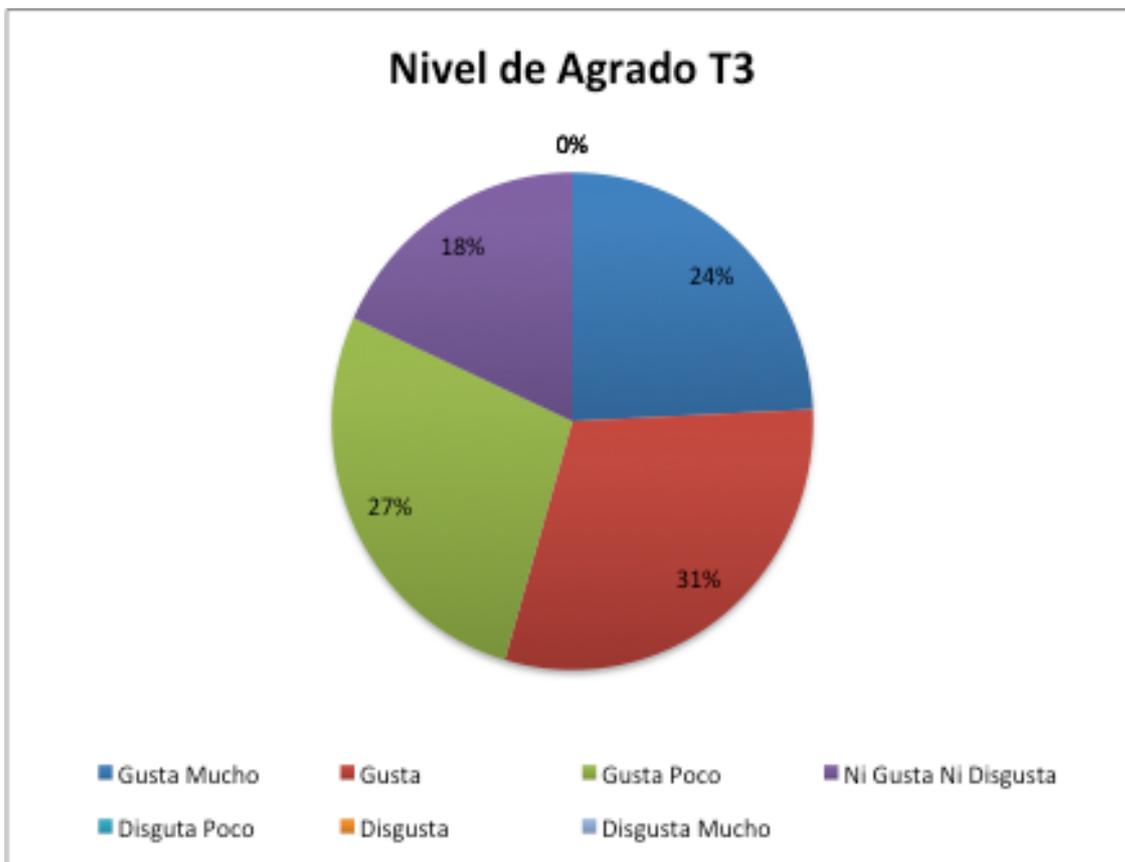
En la tabla 29, se muestra el resumen comparativo de los resultados porcentuales obtenidos en es estudio de nivel de agrado.

Tabla 29.

*Nivel de agrado comparativo de los prototipos.*

<b>Tratamiento</b>	<b>Nivel de Agrado</b>			
	<b>Gusta Mucho</b>	<b>Gusta</b>	<b>Gusta Poco</b>	<b>Indiferente</b>
<b>615 (T3)</b>	24%	31%	27%	18%
<b>413 (T8)</b>	30%	37%	21%	12%
<b>819 (T9)</b>	33%	46%	15%	6%

El prototipo que mayor nivel de agrado presenta es el T9 (819), seguido de T8 (413) y el que menos agrado fue el T3 (615). En los gráficos 3, 4 y 5 se encuentra expresado de manera visual lo expresado en esta tabla junto con su respectiva explicación en cada uno de estos.



*Figura 3.*

Agrado muestra 615 (T3).

De acuerdo a lo que muestra el gráfico 3, al 24% de los jueces gusta mucho la muestra, al 31% de los jueces gusta, al 27% gusta poco y al 18% le es indiferente (ni gusta ni disgusta).

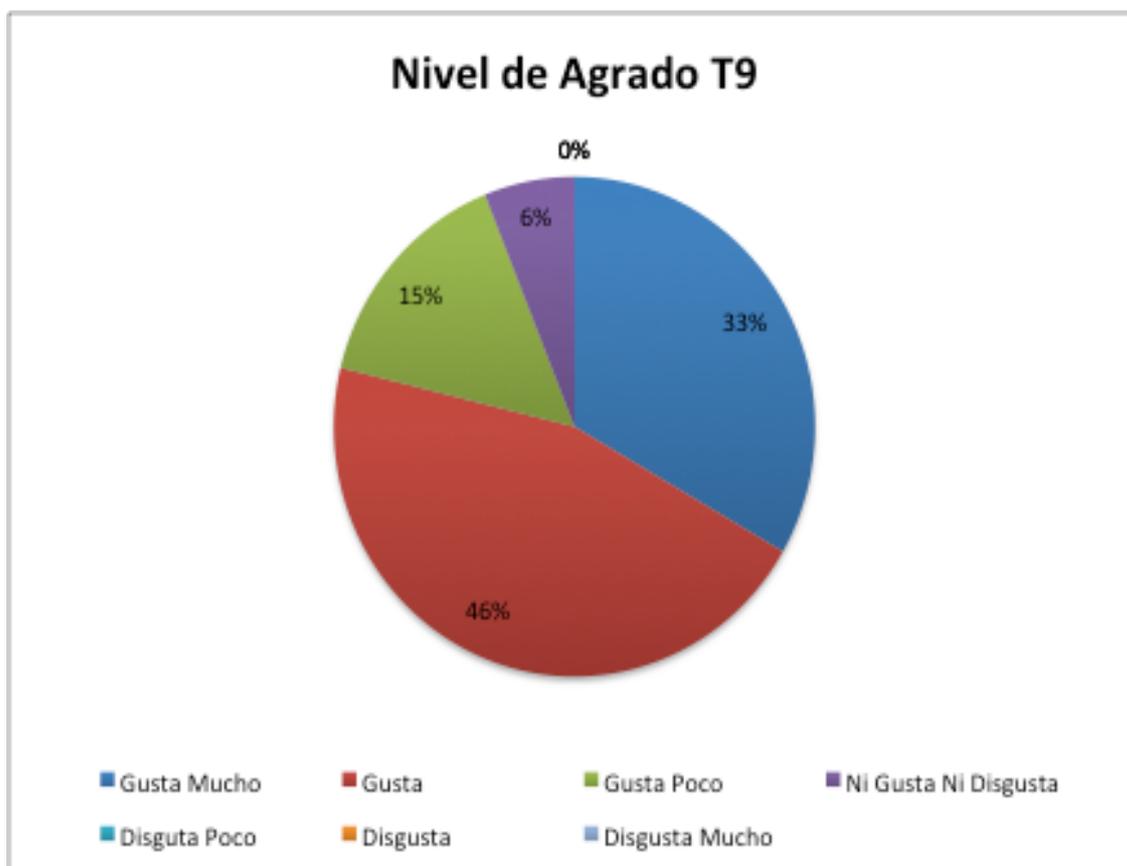
En el gráfico 4 se presenta que al 30% de los jueces gusta mucho la muestra 413, al 37% de los jueces gusta, al 21% gusta poco y al 12% ni gusta ni disgusta.



*Figura 4.*

Agrado muestra 413 (T8).

Con respecto a la muestra 819, el grafico 5 muestra que el 33% de los jueces gusta mucho de este prototipo, al 46% le gusta, al 15% gusta poco y únicamente al 6% de los jueces les es indiferente.



*Figura 5.*

Agrado muestra 819 (T9).

Los resultados de la tabla muestran congruencia entre el estudio de preferencia y nivel de agrado, los tratamientos T3, T8 y T9 obtuvieron la preferencia 3, 2 y 1 y un nivel de agrado de 5,61, 5,85 y 6,06 respectivamente, adicionalmente se observa que ninguno de los panelistas dio una respuesta desfavorable al producto ya que las opciones de disgusta poco, disgusta y disgusta mucho obtuvieron un 0% de frecuencia para las 3 muestras. El T9 (65% de suero de leche y 25% de mora) presentan una aceptabilidad mayor por parte de los consumidores, obteniendo la mayor preferencia y el mayor nivel de agrado.

## **7 Conclusiones y Recomendaciones**

### **7.1 Conclusiones**

En conclusión, se logro cumplir con los objetivos planteados durante este estudio, se consiguió formular una bebida alcohólica fermentada a base de suero de leche y mora, con una alta aceptación por parte de los consumidores. Esta bebida cumple con la normativa INEN vigente para vino de frutas, obteniendo 14,7 de grado alcohólico, y menos de 1 mg/L de metanol. A pesar que todos los prototipos cumplen con los requisitos de la norma, de acuerdo a los datos obtenidos en los estudios sensoriales, el tratamiento con mayor potencial de comercialización es el T9, consiguiendo un nivel de agrado de 6,06 sobrepasando para los tratamientos T3 (5,61) y T8 (5,85), estos resultados fueron obtenidos sobre una escala hedónica de 7 puntos; y obteniendo la mayor preferencia estadísticamente significativa en el estudio, siendo comparado con los tratamiento T3 y T8.

Con respecto a la validación del método casero para la determinación de metanol, debido a que no existió una diferencia estadísticamente significativa con respecto a los datos obtenidos mediante el método oficial, se puede concluir que este protocolo puede servir para la determinación de metanol en bebidas tipo vino, sin embargo es necesario profundizar en este tema.

## 7.2 Recomendaciones

A pesar que los datos con respecto a la validación del método para el análisis de metanol son favorables es recomendable reproducir esta metodología con un estudio a profundidad, en el cual se tome en cuenta la normativa ISO 17025:2005 en la que se describe los requisitos para la validación de nuevos métodos de análisis, por lo que se recomienda lo siguiente:

Comparar el método que se desea validar con una metodología certificada, esta comparación se la debe hacer periódicamente de tal manera que se puede generar una trazabilidad para un posterior análisis estadístico, con la finalidad de comprobar su precisión y exactitud, además es necesario que los datos y la estadística obtenidos demuestren estabilidad a lo largo del periodo en que se utiliza el método a validar; adicionalmente es necesario demostrar la reproducibilidad de los datos obtenidos para generar confianza en el método. A pesar que se pueda tener datos concluyentes esto no demuestra que el método sea eficaz, por lo que es necesario que agentes externos efectúen las mismas pruebas con el fin de demostrar que la reproducibilidad del método no es únicamente en el laboratorio en el que se ha venido haciendo el estudio, sino que se puede extrapolar a otros laboratorios. También es necesario determinar los límites tanto inferiores como superiores de detección, así como las posibles limitaciones, e incluso la incertidumbre del método que se desea validar, y por último es necesario definir el alcance del método, es decir en que productos se lo puede utilizar manteniendo el grado de confianza.

Por último, con respecto al estudio sensorial, se recomienda aumentar el tamaño de población al cual se efectúe tanto el estudio de preferencia como el nivel de agrado, esto con el fin de aumentar con confianza de los resultados obtenidos; adicionalmente sería recomendable efectuar un perfil de sabor del producto con jueces entrenados y comparándolo con vinos (de uva) comerciales.

## Referencias

- Ayala, C., Valenzuela, C. P., & Bohórquez, Y. (2013). Caracterización fisicoquímica de mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) en seis grados de madurez. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 11 (2), 10-18.
- Beecher, J., Drake, M., Foegeding, E., & Luck, P. (2008). *Factors regulating astringency of whey protein beverages. J Dairy Sci*, 91, 2553-60.
- Beucler, J., Drake, M., & Foegeding, E. (2005). *Design of a beverage from Whey permeate. Journal of Food Science*, 70, 277-285.
- Bhavsagar, M., Bin Awaz, H., & Patange, U. (2010). *Manufacture Of Pineapple Flavoured Beverage From Chhana Whey. J. Dairying, Foods & H.S*, 29 (2), 110- 113.
- Blom, W. A., Lluch, A., Stafleu, A., Vinoy, S., Holst, J. J., & Schaafsma, G. (2006). *Effect of a high-protein breakfast on the postprandial ghrelin response. Am J Clin Nutr*, 83, 211-220.
- Blouin, J., & Peynaud, É. (2004). *Enología práctica: conocimiento y elaboración del vino*. Mundi-Prensa Libros.
- Borsheim, E., Aarsland, A., & Wolfe, R. (2004). *Effect of an amino acid, protein, and carbohydrate mixture on net muscle protein balance after resistance exercise. Int JSport Nutr Exe*, 14 (3), 255-71.
- Bowen, J., Noakes, M., & Clifton, P. M. (2006). *Appetite regulatory hormone responses to various dietary proteins differ by body mass index status despite similar reductions in ad libitum energy intake. J Clin Endocrinol Metab*, 91, 2913–2919.
- Bowen, J., Noakes, M., Trenerry, C., & Clifton, P. M. (2006). *Energy intake, ghrelin, and cholecystokinin after different carbohydrate and protein preloads in overweight men. J Clin Endocrinol Metab*, 91, 1477–1483.
- Bushman, B., Phillips, B., Isbell, T., Ou, B., Crane, J., & Knapp, S. (2004). *Chemical composition of cranberry (*Rubus spp.*) seeds and oils and their antioxidant potential. J. Agric. Food Chem.*, 52, 7982–7987.

- Caitlin, E., Etzel, M. R., & LaClair. (2010). *Ingredients and pH are Key to Clear Beverages that Contain Whey Protein*. *Journal of Food Science*, 75 (1), C21-C27.
- Caitlin, E., Etzel, M. R., & LaClair. (2009). *Turbidity and Protein Aggregation in Whey Protein Beverages*. *Journal Of Food Science*, 74 (7), 526-35.
- Chauhan, A. K., Kumar, J., & Rajoria, A. (2010). *Anti-oxidative and anti carcinogenic role of lycopene in human health – A Review*. *J. Dairying, Food and Home Sci*, 29, 3-4.
- Cuellas, A. (2008). Aprovechamiento industrial del suero de quesería. Obtención de una bebida energizante a partir del efluente. *Tecnología Láctea Latinoamericana*, 49, 56-58.
- Cuellas, A., & Wagner, J. (2010). Elaboración de bebida energizante a partir de suero de quesería. *Revista del Laboratorio Tecnológico del Uruguay* (5), 54-57.
- Cummings, D. E., Frayo, R. S., Marmonier, C., Aubert, R., & Chapelot, D. (2004). *Plasma ghrelin levels and hunger scores in humans initiating meals voluntarily without time and food related cues*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 287, E297–E304.
- Cáceres, H. (2003). Estudio preliminar del efecto de la microfiltración tangencial sobre la capacidad antioxidante en jugos de fruta clarificados. *Escuela Agrícola Panamericana*.
- Diary Foods. (1 de Agosto de 2005). *Whey's Future in Beverages*. Recuperado el 14 de Octubre de 2017, de Diary Foods: [www.diaryfood.com/articles/whey-s future-in beverages](http://www.diaryfood.com/articles/whey-s-future-in-beverages)
- Elizarrarás, A., Martini, J., & Cansino. (2015). Optimización de las condiciones de termoultrasonificación del jugo de zarzamora sobre las características físicoquímicas, microbiológicas y antioxidantes. *Masters Thesis, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Hidalgo-Mexico*.
- Flanagan, D., Evans, M., Monsod, T., Rife, F., Heptulla, R., & Tamborlane, W. (2003). *The influence of insulin on circulating ghrelin*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 284, E313–E316.

- García, M., Quintero, R., & López-Munguía, A. (2004). *Biología de Alimentos*. Mexico: Editorial Limuna S.A.
- García, D., Vitoria-Matos, A., & Moreno-Álvarez, M. (2003). Características físico químicas y composición de ácidos grasos del aceite crudo extraído de residuos de mora (*Rubus glaucus* Benth). *Grasas y Aceites*, 54 (3), 259-263.
- Gerder, S. (2007). *Why Whey for Clear Beverages? Ingredient Technology*, 96.
- González-Martínez, C., Albors, A., Becerra, M., Carot, J., Cháfer, M., & Chiralt, A. (2002). *Influence of substituting milk powder for whey powder on yogurt quality. Trends in Food Science & Technology*, 13 (9-10), 334-340.
- Ha, E., & Zemel, M. (2003). *Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people(Review)*. *J Nutr Biochem*, 14 (5), 251-8.
- Hoogstraten, J. (1987). *Process for Preparation of Chocolate Drink Based on Acid Whey. IDF Bulletin*, 212, 17.
- Horton, B. S. (1995). Whey processing and utilization. *Bull. IDF*, 308, 2-6.
- Jeličić, I., Božanić, R., & Tratnik, L. (2008). *Whey Based Beverages New Generation Of Dairy Products. Mljekarstvo*, 58 (3), 257-274.
- Layman, D. (2003). *The role of leucine in weight loss diets and glucose homeostasis. J Nutr*, 261S-7S.
- Layman, D., & Baum, J. (2004). *Dietary protein impact on glycemic control during weight loss. J Nutr*, 968S-73S.
- Mertz, C., Cheynier, V., Gunata, Z., & Brat, P. (2007). *Analysis of Phenolic Compounds in two Blackberry species (Rubus glaucus and Rubus adenotrichus) by High performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection and Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry. J Agric. Food Chem*, 8610-8625.
- Minhas, S., & Sood, S. (2011). *Organoleptic And Microbiological Evaluation Of Cheese Whey And Soy-Whey Based Pear Beverage. J. Dairying, Foods & H.S.*, 30 (2), 90-93.

- Mipro. (2013). *Políticas Industriales En El Sector De Alimentos*. Quito: MIPRO.
- Miranda, O. (2007). Elaboración de una bebida fermentada a partir del suero de queso. Características distintivas y control de calidad. *Revista Cubana Alimentación y Nutrición*, 17 (2), 103-108.
- Ocaña, I. (2012). Estudio Del Vino De Mora De Castilla (*Rubus Glaucus Benth*) Elaborado A Tres Proporciones Distintas De Fruta: Agua Y Tres Niveles De Dulzor. Universidad Técnica de Ambato, Facultad de ciencia e ingeniería en alimentos. Ambato: Carrera de ingeniería en alimentos.
- Ochoa, C., & Ayala, A. (2004). Los Flavonoides: Apuntes Generales y su Aplicación en la Industria de Alimentos. *Ingeniería y competitividad*, 6 (2), 96-104.
- Pereira-Lima, G., Vianello, F., Corrêa, C., Da-Silva-Campos, R., & Galhardo Borguini, M. (2014). *Polyphenols in fruits and vegetables and its effect on human health*. *Food Nutr Sci*, 5, 1065–1082.
- Rajoria, A., Chauhan, A., & Kumar, J. (2011). *Formulation Of Tomato Juice Enriched Whey Beverage Using Response Surface Methodology*. *J. Dairying, Foods & H.S.*, 30 (1), 1-14.
- Saad, M. F., Bernaba, B., Hwu, C. M., Jinagouda, S., Fahmi, S., & Kogosov, E. (2002). *Insulin regulates plasma ghrelin concentration*. *J Clin Endocrinol Metab.*, 87, 3997–4000.
- Severin, S., & Xia, W. (2005). *Milk biologically active components as nutraceuticals: review*. *Crit Rev Food Sci.*, 45, 645–56.
- Smithers, G. (2008). *Whey and whey proteins from 'gutter-to-gold'*. *Int Dairy J.*, 18 (7), 695-704.
- Sánchez-Otero, J. (2009). *Introducción al Diseño Experimental*. Quito: Julio Sánchez Otero.
- Tang, J. E., Manolagos, J. J., Kujbida, G. W., Lysecki, P. J., Moore, D. R., & Phillips, S. M. (2007). *Minimal whey protein with carbohydrate stimulates muscle protein synthesis following resistance exercise in trained Young men young men*. *Appl. Physiol. Nutr. Metab* , 32, 1132-1138. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.*, 32, 1132 1138.

- Tipton, K., Elliott, T., Cree, M., Aarsland, A., & Sanford, A. (2007). *Stimulation of net muscle protein synthesis by whey protein ingestion before and after exercise. Am J Physiol Endocrinol Metab.*, 292 (1), E71–6.
- Valencia, C., & Guevara, A. (2013). Variación de la capacidad antioxidante y compuestos bioactivos durante el procesamiento del néctar de zarzamora (*Rubus fruticosus* L.). *Revista de la sociedad química de Perú*, 79, 116-125.
- Vasco, C. (2009). *Phenolic Compounds in Ecuadorian Fruits. Unpublished Doctoral Thesis, University of Agricultural Sciences (SLU), Uppsala.*
- Villacr ez, E. (1985). *Elaboración de Vino de Mora. Universidad Técnica de Ambato.*
- Villegas, C., & Albarracín, W. (2016). Aplicación Y Efecto De Un Recubrimiento Comestible Sobre La Vida  til De La Mora De Castilla (*Rubus Glaucus* Benth). *Vitae, Revista De La Facultad De Ciencias Farmacéuticas Y Alimentarias*, 23 (3), 202-209.

