

BEBIDA FERMENTADA DE SUERO DE QUESO FRESCO INOCULADA CON *Lactobacillus casei*

FERMENTED FRESH CHEESE MILKWHEY BEVERAGE INOCULATED WITH *Lactobacillus casei*

Margarita María Londoño Uribe¹; José Uriel Sepúlveda Valencia²;
Aldo Hernández Monzón³ y Jaime Eduardo Parra Suescún⁴

Resumen. Este trabajo tuvo por objetivo desarrollar una bebida fermentada de suero de queso fresco inoculada con *Lactobacillus casei*, a la cual se le evaluó la viabilidad del microorganismo, utilizando medios de cultivo selectivos, bajo condiciones anaeróbicas y, luego, se procedió a verificar su resistencia a los ácidos gástricos y sales biliares, simulando así, las condiciones del tracto gastrointestinal de los humanos. Para verificar la supervivencia durante el período de almacenamiento (21 días), la cepa, se caracterizó morfológica y bioquímicamente. Adicionalmente, se llevó a cabo la prueba de aceptabilidad, evaluando la bebida con 80 jueces. Se realizaron análisis físico-químicos, microbiológicos y sensoriales, a la materia prima y al producto elaborado, acorde a las normas vigentes en Colombia. La bebida fue saborizada con pulpa de maracuyá (*Passiflora edulis*). Se obtuvieron recuentos de viabilidad a pH 2,0, en agar MRS de $5,38 \cdot 10^7$ ufc·g⁻¹ y $1,3 \cdot 10^6$ ufc·g⁻¹ y en agar M17 de $6,96 \cdot 10^7$ ufc·g⁻¹ y de $1,16 \cdot 10^6$ ufc·g⁻¹, en los días 1 y 21, respectivamente. A pH 7,0, en agar MRS, se registraron valores de $3,37 \cdot 10^7$ ufc·g⁻¹ y $1,56 \cdot 10^6$ ufc·g⁻¹ y en agar M17 de $8,85 \cdot 10^7$ ufc·g⁻¹ y de $1,82 \cdot 10^6$ ufc·g⁻¹, en los días 1 y 21, respectivamente. La bebida desarrollada, tuvo una aceptación de "me gusta", y presentó una vida de anaquel de hasta 21 días.

Palabras claves: Bebida láctea, *Lactobacillus casei*, bebidas probióticas, consumidores, viabilidad de microorganismos.

Abstract. The objective of this research was to develop a fermented fresh cheese milkwhey beverage inoculated with *Lactobacillus casei*, to which the viability of microorganism was evaluated using selective cultivation means under anaerobic conditions and then it was verified its biliary resistance to gastric acids and salts, simulating this way, the conditions of gastrointestinal tract of humans. To verify the survival during the period of storage (21 days), the stump was characterized morphological and bio-chemically. Additionally the test of acceptability was carried out evaluating beverage with 80 judges. Physical-chemical, microbiological and sensorial analysis were made to raw material and to elaborated product, according to effective norms in Colombia. The beverage was flavored with pulp of maracuyá (*Passiflora edulis*). Counts of viability to pH 2.0 were obtained, in MRS agar of $5,38 \cdot 10^7$ ufc·g⁻¹ and $1,3 \cdot 10^6$ ufc·g⁻¹ and in M17 agar of $6,96 \cdot 10^7$ ufc·g⁻¹ and $1,16 \cdot 10^6$ ufc·g⁻¹, in days 1 and 21, respectively. To pH 7,0, in MRS agar values of $3,37 \cdot 10^7$ ufc·g⁻¹ and $1,56 \cdot 10^6$ ufc·g⁻¹ were obtained and in M17 agar, values of $8,85 \cdot 10^7$ ufc·g⁻¹ and $1,82 \cdot 10^6$ ufc·g⁻¹, in days 1 and 21, respectively. The developed beverage had an acceptance of "I like", and presented a shelf life up to 21 days.

Key words: Milky beverage, *Lactobacillus casei*, probiotic beverages, consuming, viability of microorganisms.

El suero, subproducto de la fabricación de queso fresco, aunque tiene un contenido protéico bajo, sus proteínas son de alto valor biológico (por su contenido en triptófano, lisina y aminoácidos azufrados), tienen una calidad igual a las del huevo

y no son deficientes en ningún aminoácido. Además, el suero presenta una cantidad rica de minerales donde sobresale el potasio, seguido del calcio, fósforo, sodio y magnesio. Cuenta también con vitaminas del grupo B (tiamina, ácido pantoténico,

¹ Profesora Asistente. Politécnico Colombiano "Jaime Isaza Cadavid". Facultad de Ciencias Agrarias. A.A. 4932, Medellín, Colombia.

<mmllondono@elpoli.edu.co>

² Profesor Asociado. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Facultad de Ciencias Agropecuarias. A.A. 1779, Medellín, Colombia.

<jusepul@unalmed.edu.co>

³ Profesor Titular. Universidad de la Habana. Departamento de Alimentos, Instituto de Farmacia y Alimentos – IFAL. CP 13600, La Habana, Cuba. <Aldo@ifal2.uh.cu>

⁴ Profesor Auxiliar. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. Facultad de Ciencias Agropecuarias. A.A. 1779, Medellín, Colombia. <jeparrasu@unalmed.edu.co>

Recibido: Agosto 22 de 2007; aceptado: mayo 25 de 2008

riboflavina, piridoxina, ácido nicotínico, cobalamina) y ácido ascórbico. Así mismo, posee lactosa, glúcido reductor, que por hidrólisis produce glucosa y galactosa, siendo esta última componente importante de los tejidos nerviosos. Investigaciones recientes han demostrado la diversidad de usos nutricionales de este producto, concluyéndose que es más beneficioso emplearlo que convertirlo en afluente.

Según Agrocadenas (2007) y la Federación Colombiana de Ganaderos (Fedegan) (2006), la producción de leche en Colombia, para el año 2006 fue de 6.024 millones de litros (su participación fue de un 10% del PIB, dentro del sector de alimentos (21% PIB), de los cuales, aproximadamente, un 18% (1.084 millones de litros) se destinó a la producción de quesos y un 9% (542 millones de litros) a leches fermentadas, lo que quiere decir que la producción nacional de suero de queso, corresponde a 921.672 millones de litros.

El suero vertido a corrientes de agua, por su valor nutritivo y energético, es consumido por bacterias y otros microorganismos que utilizan el oxígeno del agua; la demanda biológica del lactosuero es de 40000 a 50000 de $O_2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, el oxígeno de un río no contaminado es de $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, al descender a 4 de $O_2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ desaparecen los peces, incluyendo especies poco exigentes en oxígeno. El vertido de un litro de suero causaría la muerte de todos los peces contenidos en 10 toneladas de agua.

Cuando el agua se queda sin oxígeno, los microorganismos anaerobios y facultativos transforman la materia orgánica en compuestos que disminuyen el pH del agua y producen malos olores.

Entre los productos de exitosa aceptación que emergen del suero debido a sus bajos costos de producción, grado de calidad alimenticia y aceptable sabor, se encuentran las bebidas refrescantes, producto de la mezcla de suero con jugos frescos de frutas.

El marcado interés surgido en la actualidad, por parte de los consumidores, por alimentos de alto valor nutritivo, saludables y de poco aporte calórico, ha hecho posible el desarrollo de una gama de productos obtenidos a partir de algunas cepas de microorganismos intestinales, como las bacterias ácido lácticas y las bifidobacterias, algunas de las cuales colonizan el tracto gastrointestinal por su

compatibilidad con este ambiente, como son el *Lactobacillus reuteri*, el *Lactobacillus acidophilus* y el *Lactobacillus casei*, cuya ingestión regular se considera, reduce los niveles de colesterol sérico, ayuda a prevenir ciertos tipos de cáncer y mejora las funciones digestivas e intestinales, entre otras características.

El objetivo general del trabajo consistió en elaborar una bebida fermentada inoculada con *Lactobacillus casei* usando suero de queso fresco, a la cual se le efectuaron análisis de viabilidad a pH 2 y a pH 7 y de aceptabilidad, con el fin de dar una utilización óptima al suero producido en quesería e incrementar los efectos benéficos de este producto para el consumidor, ya que este microorganismo, ha sido evaluado bajo las condiciones de pH estomacal e intestinal, que lo identifican como microorganismo probiótico, planteándose como objetivos específicos el valorar la supervivencia *in vitro* del *Lactobacillus casei* a las mismas condiciones del pH estomacal, evaluar la composición físico – química de la bebida, calificar la aceptabilidad de la bebida con consumidores potenciales y determinar la viabilidad de la bebida durante la conservación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización. La investigación tuvo lugar en las instalaciones de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. La elaboración de la bebida láctea, se realizó en el Laboratorio de Productos Lácteos. Los análisis físico – químicos y sensoriales, se llevaron a cabo en el Laboratorio de Control de Calidad de la Planta de Leches. Las pruebas bioquímicas para identificar el tipo de probiótico y la viabilidad de los microorganismos, se realizaron en el Laboratorio de Microbiología del Colegio Mayor de Antioquia.

Materiales. Las materias primas utilizadas en la elaboración de la bebida fueron:

Suero de queso fresco entero; crema de leche al 65% de materia grasa; cultivo probiótico: *Lactobacillus casei*; cultivos: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*; sacarosa; jarabe de azúcar invertido; pulpa de maracuyá; carboxi metil celulosa (CMC); cultivo probiótico *L. casei* 01. Freeze-dried Lactic Culture for Direct Vat Set

(DVS). Mesophilic Lactic Culture type nu-trish. T° almacenamiento – 8°C .

Métodos de evaluación utilizados

Evaluación físico - química.

- Acidez: según método AOAC 947.05 / 90.
- pH: método AOAC 981.12 / 90.
- Sólidos totales: método AOAC 925.105 / 90.
- Proteína: método AOAC 920.05 / 90.
- Materia grasa: método AOAC 989.04 / 90, método de Babcock para leches descremadas (Jaramillo, Mejía y Sepúlveda, 1999).
- Cenizas: método AOAC 945.05 / 90.
- Lactosa: método del reactivo de Teles.
- Sólidos solubles: método AOAC932.12/90.
- Azúcares reductores: método del ácido 3 – amino – 5 – nitrosalicílico.
- Contenido en minerales: método espectrofotométrico de absorción atómica (aa) (Jaramillo, Mejía y Sepúlveda, 1996).
- Viscosidad: método de Brookfield, donde se empleó una aguja número 1 y 100 rpm, temperatura de 20°C (Jaramillo, Mejía y Sepúlveda, 1999).

Análisis microbiológicos. Recuento en agar MRS. Tinción de Gram. Recuento en agar M17. Recuento de

mesófilos, (Número más probable NMP) coliformes totales. NMP coliformes fecales (Invima, 1998).

Evaluación sensorial. Se realizó una prueba de aceptación, utilizando escalas hedónicas verbales de siete puntos. A cada uno de los calificativos empleados en la escala, se le asignó un valor de 1 a 7 (Watts, 1992).

Para la evaluación, se utilizaron 80 jueces consumidores potenciales del producto. Cada una de las muestras, se presentaron aleatoriamente a cada evaluador, advirtiéndoles que se trataba de una bebida elaborada a partir de suero. Las muestras, siempre, se colocaron en recipientes idénticos y codificados con números aleatorios.

Diseño de la Investigación

Formulación y costos de la bebida. La cantidad de ingredientes utilizados en la elaboración de la bebida, se definió según la revisión de literatura sobre la composición de una bebida láctea y los ensayos previos a la investigación (Londoño y Marcial, 1999; Peña y Flórez, 2001; Ministerio de Salud, Colombia, 1986 e ICONTEC, 1973,1977). Su formulación y los respectivos costos, se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Formulación y costos para la elaboración de una bebida fermentada a partir de suero de queso fresco, inoculado con *Lactobacillus casei*.

Ingredientes	Grasa %	SNG* %	Peso kg	Grasa kg	SNG* kg	\$** kg	Total (\$)
Suero entero	0,3	5,8	82,13	0,24	4,76	30	2463,90
Crema de leche	65	3,15	1,30	0,84	0,04	5000	6500
Pulpa de maracuyá (<i>Passiflora edulis</i>)			10			4500	45000
Jarabe de azúcar invertido			2,1			960	2016
Sacarosa			4,37			1800	7866
Estabilizante			0,1			21000	2100
Cultivo <i>L. casei</i>						14000	14000
Cultivo de yogurt						12000	12000
Total			100	1,08	4,8		91.945,90***

*SNG: Sólidos No Grasos

**\$ (Pesos Colombianos)

***\$ 91,94/kg (a Junio de 2007).

Proceso tecnológico seguido para la elaboración de la bebida. El procedimiento seguido

para la elaboración de la bebida fermentada de suero de queso, se presenta en la Figura 1.

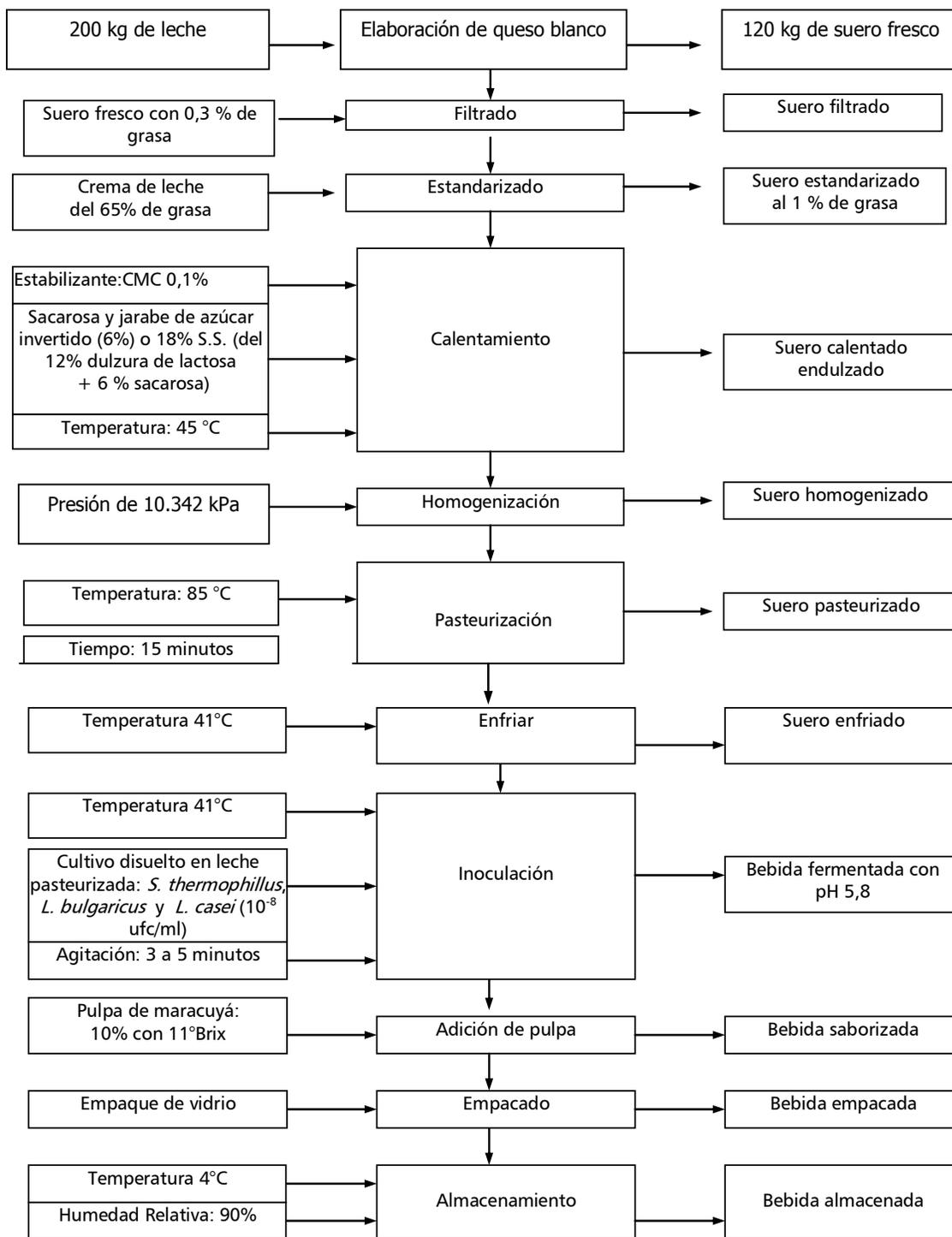


Figura 1. Flujograma para la elaboración de una bebida fermentada con base en suero de queso fresco (Londoño y Marciales, 1999; Jaramillo, Mejía y Sepúlveda, 1996).

De la materia prima suero, se tomaron tres muestras así:

- Muestra 1 – Suero pasteurizado
- Muestra 2 – Suero recién inoculado
- Muestra 3 – Suero fermentado

Para la caracterización de las materias primas (suero y pulpa) y de la bebida, se realizaron los análisis físico – químicos, por triplicado, citados en la Tabla 2. Para la bebida, se elaboraron tres templates (100 kg) y a cada una, se le realizaron los análisis físico – químicos, en los días 1, 7, 14 y 21.

Tabla 2. Análisis físico –químicos realizados a las materias primas y a la bebida fermentada.

Análisis	Suero	Pulpa	Bebida
Acidez	X	X	X
pH	X	X	X
Viscosidad	X		X
Sólidos totales	X	X	X
Proteína	X		X
Materia grasa	X		X
Cenizas	X		X
Lactosa	X		X
Minerales*	X		X
Sólidos solubles	X	X	X
Azúcares reductores	X		X
Humedad	X	X	X

*Minerales: Calcio, Fósforo, Magnesio, Sodio y Potasio.

Para las muestras de suero y para los cultivos lácticos empleados, se hicieron los análisis microbiológicos que se señalan en la Tabla 3.

MRS y M17, tanto a pH ácido (2,4) como a pH neutro (7,2). Éstos, se efectuaron en los días 1, 7, 14 y 21.

Para analizar la viabilidad de los microorganismos en la bebida, se ejecutaron recuentos en dos agares a saber,

La vida útil del producto, se consideró de 21 días, según la Resolución 02310 de 1986, del Ministerio de Salud, para este tipo de bebidas.

Tabla 3. Análisis microbiológicos realizados a las materias primas y a los cultivos de microorganismos.

Muestra	Recuento en agar MRS	Tinción de Gram	Recuento en agar M17	Recuento de mesófilos	NMP* coliformes totales	NMP* coliformes fecales
Suero pasteurizado sin inocular				X	X	X
Suero recién inoculado	X	X	X			
Suero fermentado	X	X	X			
Cultivo <i>L. casei</i>	X	X	X			
Cultivo TB3 yogurt	X	X	X			

*NMP: Número más probable.

Procesamiento de los resultados. Para cada uno de los análisis, es decir, microbiológicos, sensoriales y físicoquímicos, se utilizó un diseño completamente al azar, donde los tratamientos corresponden a las mediciones hechas los días 1, 7, 14 y 21 y, cada uno

de los tratamientos, tuvo tres (3) repeticiones (batches).

Se realizaron análisis de varianza y pruebas de rango múltiple, por el método LSD ó DMS (Diferencia

Mínima Significativa) ó t – Student, para observar entre cuáles medias, se presenta diferencia estadísticamente significativa a un nivel de confianza del 95%. Para ello, se empleó el paquete estadístico Statgraphics Plus versión 5.1

El Modelo del diseño completamente al azar que se empleó, fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = Recuento de microorganismos, análisis sensorial, minerales, cenizas, lactosa, proteína, grasa, acidez, pH, sólidos, sólidos solubles, humedad, viscosidad y azúcares.

M = Efecto fijo del promedio general o común a todas las observaciones.

T_i = Efecto fijo del tratamiento (o cada día del tratamiento) día i , donde $i = 1, 7, 14, 21$.

E_{ij} = Efecto aleatorio del error experimental, común a todas las observaciones, donde $i =$ día y $j =$ cada registro.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación físico química de las materias primas y la bebida fermentada. En la Tabla 4, se presentan los resultados de la caracterización de las materias primas empleadas en la elaboración de la bebida fermentada (suero y pulpa de maracuyá).

Tabla 4. Caracterización de las materias primas empleadas en la elaboración de la bebida fermentada.

	S.T.	Grasa	Acidez	pH	S.S.	Cenizas	Proteína	Lactosa	Azúcares	P	Ca	Mg	Na	K	Viscosidad
Suero pasteurizado sin inocular	14,00	1,00	0,08	6,47	13,00	0,40	0,95	4,40	14,00	0,36	0,45	0,09	0,59	0,04	28,63
Suero recién inoculado	14,00	1,00	0,15	5,85	12,80	0,40	0,96	4,40	20,00	0,36	0,43	0,09	0,52	0,04	54,30
Suero fermentado	17,00	1,00	0,32	4,41	12,20	0,45	1,00	4,20	21,60	0,36	0,42	0,09	0,52	0,04	46,00
Pulpa de maracuyá	24,00		2,81	2,65	21,00										

S.S.: Sólidos Solubles

S.T.: Sólidos Totales

Minerales: $g \cdot 100 g^{-1}$

Viscosidad: CP

Otros componentes: %

Los valores obtenidos concuerdan con los obtenidos por Peña y Flórez (2001), quienes registran cifras de 6,7 y 0,09%, con los presentados por Londoño y Marciales (1999), de 6,47 y 0,1% de acidez, y con Gómez *et al.* (1999), quienes obtuvieron datos entre 6,10 y 6,50 y 0,1 a 0,12%, para el pH y la acidez, respectivamente.

Los sólidos totales y la humedad, coinciden con los expresados por Jaramillo, Mejía y Sepúlveda (1996) y por el Ministerio de Salud de Colombia (1986).

La grasa para la bebida, se estandarizó al 1%, donde se partió de un suero del 0,3%. Lo anterior, se llevó a cabo de acuerdo con lo recomendado por la Resolución 02310 del Ministerio de Salud de Colombia (1986), que sugiere que las grasas en las

bebidas, pueden oscilar entre el 0,0% y el 3,5%, y con Jaramillo, Mejía y Sepúlveda (1996), quienes las clasifican en bebidas enteras, semidescremadas y descremadas.

Los sólidos solubles, son similares con los medidos por Jaramillo, Mejía y Sepúlveda (1996) (12 – 14%).

Las cenizas (0,40%), son afines en magnitud con las halladas por Peña y Flórez (2001), quienes informan valores de 0,39% y están por debajo de los de Gómez *et al.* (1999) (0,47 a 0,51%).

La proteína resultante (0,96%), está muy por encima de la referida por Gómez *et al.* (1999), y Peña y Flórez (2001) (0,41% a 0,45% y 0,83%, respectivamente).

La lactosa (4,4%), difiere levemente de la mencionada por Peña y Flórez (2001), quienes dan cuenta de valores de 4,69% y de los citados por Gómez *et al.* (1999), 4,52 a 5,04%.

Los minerales, Calcio, Potasio, Sodio, Magnesio y Fósforo, no difieren con los enunciados por Peña y Flórez (2001), Gómez *et al.* (1999) y Paz (2000).

Los azúcares, se asemejan a los presentados por Jaramillo, Mejía y Sepúlveda (1996) (12–14,5%).

En la Tabla 5, se muestran los resultados de los análisis fisicoquímicos efectuados a la bebida.

Tabla 5. Resultados de los análisis físico - químicos a la bebida fermentada para los diferentes días analizados.

	S.T.	Grasa	Acidez	pH	S.S.	Cenizas	Proteína	Lactosa	Azúcares	P	Ca	Mg	Na	K	Viscosidad
Día 1	16,00	0,48	0,81	3,73	14,10	0,50	1,00	4,40	14,6	0,32	0,42	0,07	0,357	0,07	57,10
Día 7	17,00	0,40	0,81	3,59	14,00	0,65	0,98	4,39	14,00	0,32	0,42	0,08	0,38	0,05	48,80
Día 14	16,50	0,40	0,81	3,48	14,00	0,50	0,96	4,35	15,20	0,42	0,42	0,10	0,43	0,18	44,86
Día 21	17,50	0,40	0,90	3,51	14,30	0,45	0,95	4,30	14,60	0,38	0,39	0,08	0,39	0,08	45,26

S.T.: Sólidos Totales; S.S.: Sólidos Solubles; Minerales: g·100 g⁻¹; Viscosidad: centipoises (cp); Otros componentes: %

Los resultados de la Tabla 5, indican diferencias estadísticamente significativas entre las medias de diferente día, para cada uno de los componentes estudiados, a un nivel de confiabilidad del 95%, como lo corroboran las pruebas de rango múltiple, donde se presentan los siguientes resultados:

días 1 (3,71%) y 14 (3,46%), divergen de las restantes (3,57% y 3,58%). Los coeficientes de determinación y de variación para ambos componentes son 99,54% y 0,40% para el primero y 89,07% y 1,08% para el segundo. Los valores de acidez obtenidos, son superiores a los expuestos por Gómez *et al.* (1999) (0,454% a 0,554%) y por Londoño y Marciales (1999) (0,38% a 0,42%), contrastando también en el pH, donde se obtuvo entre 4,45 y 4,30 (Londoño y Marciales, 1999) y los valores de pH se amoldan con los de Gómez *et al.* (1999) (3,79 a 4,13) y con lo reportado en la Resolución 02310 de 1986, donde una bebida fermentada debe poseer una acidez, en producto adicionado de pulpa, entre 0,6 a 0,9% de acidez. Así mismo, encajan con los valores obtenidos por Salazar (2003), en una bebida con adición de avena, que señala una acidez desde 0,59% a 0,92% de ácido láctico y un pH de 4,32 a 5,09, del cual difiere. En una leche sin pulpa, cultivada con bifidobacterias, la acidez dio superior a 0,69% y un pH de 4,61 a 6,06, con los cuales disiente (Arenas, 1997). Según Rasic y Kurmann (1978) la acidez de una bebida fermentada debe estar entre 0,85% y 0,95% de ácido láctico.

Las medias en los sólidos totales, difieren entre el día 1 y los días 7 y 21, y, entre el día 14 y el 21, presentando valores que fluctúan entre 15,83% para el día 1 y 17,33% para el día 21; con un coeficiente de determinación de 75,33% y un coeficiente de variación de 2,30 .

Según Tamime y Robinson (1998), la supervivencia de la cepa y, por tanto, la vida útil del producto, dependen del contenido de ácido (alrededor de 0,65% de ácido láctico) y de la temperatura menor de 5°C.

Los valores obtenidos son semejantes a los de Arenas (1997) (12 a 16%), Jaramillo, Mejía y Sepúlveda (1996) (14,5%), y Peña y Flórez (2001) (15,09 a 22,93%); y difieren muy levemente con lo revelado por Londoño y Marciales (1999) quienes hallaron valores máximos para los sólidos de 12,49% ± 0,38%, que se ajustan a los obtenidos en este trabajo.

La media para la grasa del día 1, discrepa de las restantes, fluctuando desde 0,48% para el día 1 y 0,40% para el día 21, observándose un coeficiente de determinación de 97,16% y de variación de 1,66%. Estos valores, armonizan con el porcentaje de grasa que debe tener una bebida baja en calorías, como lo plantean Jaramillo, Mejía y Sepúlveda (1996) y la Resolución 02310 de 1986 del Ministerio de Salud.

Las medias de los sólidos solubles de los días 1 y 21 (14,1°Bx y 14,3°Bx) son distintas a las demás

En la acidez, sólo la media del día 21 (0,90%) riñe del resto (0,81%) y para el pH, las medias de los

(14,0°Bx), no siendo muy marcada la diferencia entre ellas y presentando un coeficiente de determinación del 100%. Estos valores, concuerdan con Jaramillo, Mejía y Sepúlveda (1996), quienes aluden valores entre 12°Bx a 14,5°Bx y con la Resolución 02310 de 1986, que establece valores entre 14°Bx y 16°Bx, en este tipo de bebidas. Además, son diferentes a los de Londoño y Marciales (1999), quienes estipulan valores de 12,58°Bx a 12,11°Bx y son acordes con los de Franco (1987) de 14,13°Bx, en una bebida saborizada con naranja.

En la viscosidad, las medias de los días 1 y 7 (57,16 cp y 49,00 cp), se apartan de las restantes (45,1 cp y 45,5 cp) y en las cenizas, la 21 y la 7 (0,46% y 0,64%), difieren del resto (0,50%). En este análisis, se presentan unos coeficientes de determinación y de variación del 99,82% y 0,51%, para el primer componente y 99,11% y 1,54%, para el segundo. La Legislación Colombiana, no es muy clara en cuanto a viscosidad, para este tipo de bebidas, aunque Jaramillo, Mejía y Sepúlveda (1996), afirman que la viscosidad debe ser superior a 12 cp. Franco (1987), propone valores promedio para este parámetro de 9,46 cp. Sin embargo, Peña y Flórez (2001), obtuvieron valores de viscosidad entre 23 cp y 499,33 cp, y para las cenizas, encontraron valores entre 0,4194% a 0,3245%, los cuales son levemente diferentes a los encontrados en este trabajo, pero concuerdan con los encontrados por Gómez *et al.* (1999), quienes reseñan valores de 0,56% a 0,62%.

Para la proteína, las medias de los días 1 y 7 (1% y 0,98%) no varían entre sí, pero sí lo hacen de las de los días 14 y 21 (0,96%), presentándose un coeficiente de determinación de 78,59% y uno de variación de 0,83%. Estos valores, son acordes con los de Gómez *et al.* (1999) (0,708% a 1,009%), y con los de Londoño y Marciales (1999) (0,94% – 0,92%), y los de Peña y Flórez (2001) (0,981% a 1,551%).

En la lactosa, la media del día 21 (4,29%), discrepa de las restantes y la del día 1 (4,43%) de la 14 (4,36%) y de la 21. Para los azúcares reductores, la de los días 7 (14,26%) y 14 (15,13%), difieren del resto (14,7%). Los coeficientes de determinación y de variación para estos componentes son 79,59% y 0,70% para el primero y 84,95% y 1,07% para el segundo. Para una bebida fermentada, según Rasic y Kurmann (1978), la lactosa, varía entre 4,5 a 4,81%. La Legislación Colombiana, no establece ningún valor

con relación a los azúcares reductores. Para el fósforo, la media del día 1 (0,32 g·100 g⁻¹), difiere de las de los días 14 (0,41 g·100 g⁻¹) y 21 (0,38 g·100 g⁻¹); la del día 7 (0,32 g·100 g⁻¹) de las de los días 21 y 14 y, la del día 21, del resto, al igual que la del día 14. Sus respectivos coeficientes de determinación y de variación son 99,72% y 0,71%. En el calcio, las medias de los días 21 (0,38 g·100 g⁻¹) y 14 (0,42 g·100 g⁻¹), difieren del resto (0,42 g·100 g⁻¹) y, en el magnesio, la del día 1 (0,07 g·100 g⁻¹), difiere de las de los días 7 (0,08 g·100 g⁻¹) y 14 (0,09 g·100 g⁻¹) y la del día 14, difiere del resto. Para el sodio y el potasio, todas las medias difieren entre sí, fluctuando para el primer componente desde 0,34 g·100 g⁻¹ en el día 1, incrementando hasta el día 14 a 0,43 g·100 g⁻¹ y disminuyendo a 0,39 g·100 g⁻¹ el día 21 y para el segundo componente, desde 0,07 g·100 g⁻¹ en el día 1, disminuyendo a 0,05 g·100 g⁻¹ en el día 7 e incrementando a 0,08 g·100 g⁻¹ en el día 21. Los coeficientes de determinación y de variación, son en su orden: 99,97% y 0,06%; 84,43% y 5,33%; 99,94% y 0,22% y 99,90% y 0,70%.

Para los minerales en general, Rasic y Kurmann (1978), afirman que varían entre 0,86% y 0,92%, para bebidas fermentadas. Estos datos, concuerdan con los de Peña y Flórez (2001), para cada uno de los minerales trabajados, quienes obtuvieron valores de: calcio 0,3793%, sodio 0,4129%, fósforo 0,3192% y potasio 0,1995%.

Se analizan los resultados (físicoquímicos) obtenidos y se observa que no existe una alta variabilidad en ellos, debido a que se hizo una estandarización del producto, los tratamientos térmicos a los cuales fue sometido, fueron los necesarios para inactivar enzimas, cumpliendo con los parámetros exigidos por el Ministerio de la Protección Social y por el Invima. Adicionalmente, se efectuó un adecuado manejo de la cadena de frío, durante la vida de anaquel del producto.

Resultados de la evaluación microbiológica de los cultivos y la bebida fermentada. En la Tabla 6, se presentan los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas respectivas para la identificación del microorganismo probiótico (*L. casei*), utilizado en la elaboración de la bebida, permitiendo su plena identificación, observándose que el cultivo, no presentó ninguna contaminación y un comportamiento adecuado en ambos agares (M17 y MRS), lo que demuestra que el laboratorio, suministró una buena muestra del mismo.

Tabla 6. Pruebas bioquímicas de identificación del cultivo probiótico

N°	CATALASA	GRAM	15°C	30°C	45°C	MELIBIOSA	LACTOSA	ARABINOSA	XILOSA	SACAROSA	MANITOL	TEEPOL	ESCULINA	AGAR TOMATE	MICROORGANISMO
1-MRS	NEG	BAC. G(+) EN CADENAS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG	POS	<i>Lactobacillus casei</i>
1-M17 PEQ	NEG	COCOS G(+) EN CADENAS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG	POS	<i>Lactobacillus casei</i>
1-M17 GRAN	POS	COCOS G (+) EN RACIMO	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG	POS	<i>Lactobacillus casei</i>
2-MRS	NEG	BAC. G (+) EN CADENAS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG	POS	<i>Lactobacillus casei</i>
2-M17 PEQ	NEG	COCOS G(+) EN CADENAS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG	POS	<i>Lactobacillus casei</i>
2-M17 GRAN	NEG	COCOS G (+) EN CADENAS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG	POS	<i>Lactobacillus casei</i>
3-MRS	NEG	BAC. G (+) EN CADENAS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG	POS	<i>Lactobacillus casei</i>
3-M17	NEG	COCOS G(+) EN CADENAS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG	POS	<i>Lactobacillus casei</i>
4-MRS PEQ	NEG	BAC. G (+) EN CADENAS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG	POS	<i>Lactobacillus casei</i>
4-MRS GRAN	POS	COCOS G (+) EN RACIMO	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG	POS	<i>Lactobacillus casei</i>
4-M17 PEQ	NEG	BAC. G (+) EN CADENAS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG	POS	<i>Lactobacillus casei</i>
4-M17 GRAN	POS	COCOS G (+) EN RACIMO	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG	POS	<i>Lactobacillus casei</i>
5-M17	NEG	COCOS G (+) EN CADENAS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG	POS	<i>Lactobacillus casei</i>
5-MRS	NEG	COCOS G (+) EN CADENAS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG	POS	<i>Lactobacillus casei</i>
6-M17	NEG	COCOS G (+) EN CADENAS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG	POS	<i>Lactobacillus casei</i>
6-MRS	NEG	COCOS G (+) EN CADENAS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG	POS	<i>Lactobacillus casei</i>

Notas:

- Cocos G (+) en racimo = levaduras (contaminación)
- Cocos G (+) en cadenas = Streptococcus
- PEQ: pequeñas
- GRAN: grandes. (Pequeñas y grandes: se presentaron dos tipos de colonias).

En los recuadros donde no aparecen datos significa que no se hizo prueba bioquímica debido a que la morfología no correspondía a *Lactobacillus casei*.

En la Tabla 7, se presentan los resultados de los análisis microbiológicos efectuados a la materia prima y a los cultivos empleados.

En los mismos, se muestra cómo el recuento de mesófilos es bajo en el suero pasteurizado, haciéndolo apto para su utilización. Los recuentos en los medios MRS y M17, incrementan de un suero a otro, debido a

la adición de los microorganismos y del proceso fermentativo. Los cultivos empleados en la elaboración de la bebida, presentaron recuentos altos ($>1,6 \cdot 10^8$ ufc·g⁻¹), aptos para su utilización en la misma.

La tinción de Gram, permitió la identificación del tipo de microorganismos empleados (*Lactobacillus* y *Streptococcus*).

Tabla 7. Análisis microbiológicos de la materia prima y de los cultivos empleados en la elaboración de la bebida fermentada.

Muestra	Recuento en Agar MRS (ufc·g ⁻¹)	Tinción de Gram	Recuento en Agar M17 (ufc·g ⁻¹)	Tinción de Gram	Recuento de Mesófilos (ufc·g ⁻¹)	NMP de Coliformes Totales (ufc·g ⁻¹)	NMP de Coliformes Fecales (ufc·g ⁻¹)
Suero pasteurizado sin inocular	-	-	-	-	2.920	43	< 3
Suero recién inoculado	4,72·10 ⁶	Bacilos G + delgados – largos	1,64·10 ⁶	Bacilos G+	-	-	-
Suero fermentado pH 4,53	4,8·10 ⁶	Bacilos G + delgados – largos	1,92·10 ⁶	Bacilos G+	-	-	-
Cultivo de <i>L. casei</i>	> 1,6·10 ⁸	Bacilos G + delgados – largos. Escasos bacilos G + gruesos	> 1,6·10 ⁸	Bacilos G+	-	-	-
Cultivo TB3 yogurt	> 1,6·10 ⁸	Bacilos G + delgados – largos. Escasos bacilos G + gruesos	> 1,6·10 ⁸	Bacilos G+ cortos. Cocos G+	-	-	-

En la Tabla 8 se dan a conocer los resultados de viabilidad, que se refieren al número de microorganismos presentes y vivos en la bebida elaborada, durante los diferentes días. Estos datos, muestran que los recuentos, en cada uno de los agares y en cada uno de los medios, disminuyen a medida que transcurre el tiempo de análisis de la bebida (21 días), lo cual concuerda con la Resolución número 11961 del 30 de Agosto de (1989), del Ministerio de Salud de Colombia, en su artículo 10, que declara que la leche cultivada con probiótico, tendrá una duración de 21 días y, en su artículo 7, que declara que esta leche, deberá tener un contenido mínimo de $1 \cdot 10^5$ ufc·g⁻¹. Igualmente, Tamime y Robinson (1998), afirman que la flora

probiótica, debe sobrevivir en los productos fermentados, soportar el pH ácido del estómago y sobrevivir y, si es posible, implantarse y multiplicarse en el intestino. Según el INTA (2007), los productos probióticos, deben contener 10^7 bacterias por mililitro, valor que es levemente superior al encontrado en este trabajo. También, concuerda con lo expresado por Haines (2000) y Health Professionals (2000).

Se puede afirmar, según el análisis estadístico efectuado en el agar M17, en medio ácido, que con una probabilidad de error menor del 0,0001, existen diferencias estadísticamente significativas, entre al menos dos de las muestras, lo cual se

confirma en la prueba de rango múltiple, donde se puede observar cómo cada una de las muestras analizadas, difiere de las restantes. En este caso el R^2 fue de 99,99%.

Tabla 8. Análisis de viabilidad de los microorganismos de la bebida fermentada.

Muestra	Recuento MRS (ufc/g) (a)	Recuento M17 (ufc/g) (a)	Recuento MRS (ufc/g) (n)	Recuento M17(ufc/g) (n)
Día 1	$5,38 \cdot 10^7$ ^a	$6,96 \cdot 10^7$ ^a	$8,4 \cdot 10^7$ ^a	$8,8 \cdot 10^7$ ^a
Día 7	$3,8 \cdot 10^7$ ^b	$4,48 \cdot 10^7$ ^b	$7,2 \cdot 10^7$ ^{ab}	$7,5 \cdot 10^7$ ^b
Día 14	$2,16 \cdot 10^7$ ^c	$2,84 \cdot 10^7$ ^c	$3,1 \cdot 10^7$ ^{ab}	$3,2 \cdot 10^7$ ^c
Día 21	$1,3 \cdot 10^6$ ^d	$1,1 \cdot 10^6$ ^d	$1,5 \cdot 10^6$ ^b	$1,9 \cdot 10^6$ ^d

(a) Producto homogeneizado en agua peptonada de pH 2,4
(n) producto homogeneizado en agua peptonada de pH 7,2
abcd = Diferencias entre tratamientos ($P < 0.05$)

El error del modelo es menor del 1% (C.V.=0,74%). Al observar los promedios en la Tabla 8 y en las pruebas de rango múltiple, se puede apreciar cómo a medida que transcurre el tiempo, el recuento de microorganismos disminuye, descendiendo desde un valor promedio de $6,96 \cdot 10^7$ ufc·g⁻¹ hasta un valor de $1,1 \cdot 10^6$ ufc·g⁻¹, valor que aún a los 21 días, es un indicativo de la viabilidad de los microorganismos (valor mayor de $1 \cdot 10^6$ ufc·g⁻¹). El valor promedio fue de $3,6 \cdot 10^7$ ufc·g⁻¹. Esto, puede atribuirse a la acidificación del medio, que hace que la vida de anaquel del producto y la viabilidad de los microorganismos disminuya, lo cual coincide con lo corroborado por Tamime y Robinson (1998).

Al igual que en el medio ácido en agar M17, en el agar MRS, se presentó diferencia estadísticamente significativa, pero variando los recuentos de microorganismos desde $5,38 \cdot 10^7$ ufc·g⁻¹ hasta $1,3 \cdot 10^6$ ufc·g⁻¹. El valor promedio fue de $2,88 \cdot 10^7$ ufc·g⁻¹. En ambos casos, existe una alta variación entre las muestras y sus repeticiones. Los microorganismos disminuyen a medida que transcurre el tiempo de vida útil del producto.

De los análisis para esta prueba en medio neutro en agar M17, se infiere que existe una diferencia estadísticamente significativa a un 95 % de confianza, con una probabilidad de error menor del 0,0001 %, lo que confirma que existen diferencias entre al menos dos de las muestras y que es reafirmado en las pruebas de rango múltiple, donde las muestras varían entre sí, en cada día de análisis, desde un valor de $8,8 \cdot 10^7$ ufc·g⁻¹ hasta $1,9 \cdot 10^6$ ufc·g⁻¹, con un promedio de $4,9 \cdot 10^7$ ufc·g⁻¹.

El coeficiente de determinación es de casi el 100 % y el de variación es de un 0,78%, lo que da validez al modelo empleado para este caso.

Igual que con el agar M17, en el agar MRS, en medio neutro, existe diferencia estadísticamente significativa, con una media de $3,46 \cdot 10^7$ ufc·g⁻¹, pero a diferencia del anterior, no todas las muestras difieren entre sí, es decir, sólo las muestras al día 7 y al día 21, varían entre sí, las restantes no.

Este análisis, fue el único que no presentó una tendencia lineal a la disminución de microorganismos, con el transcurrir de los días, es decir, del día 1 al día 7, hubo un incremento y del día 7 al día 21 un decremento, lo cual incide en que el coeficiente de determinación del modelo no sea tan alto como en los casos anteriores.

Comparando los análisis en ambos medios (ácido y neutro), la viabilidad es mayor en el neutro, lo cual se puede explicar por las condiciones adversas sobre los microorganismos que ejerce el medio ácido que se presenta a nivel estomacal, según lo reporta la literatura (pH 2-3).

Este análisis demuestra, como se indica en la literatura, que el producto puede tener cualidades probióticas, debido a que la proporción de microorganismos es mayor a $1 \cdot 10^7$ por mililitro (González, Romero y Jiménez, 1994).

Según Dave y Shah (1998), un incremento en la acidez del producto, durante el almacenamiento, el peróxido de hidrógeno producido por algunos

lactobacilos, la composición del producto, la presencia de preservativos como resultado de frutas adicionadas, el antagonismo entre los microorganismos por la producción de sustancias antimicrobianas, hacen posible el descenso en el recuento de los microorganismos, lo cual concuerda con lo citado por Tamime y Robinson (1998). En este análisis *in vitro* (*ex vivo*), los microorganismos permanecieron viables a pH entre 2,0 y 7,0,

concluyéndose que pueden sobrevivir el tránsito a través del estómago, al ser ingeridos con productos lácteos, corroborando lo hallado para el *L. casei* por Goldin *et al.* (1992).

Resultados de la evaluación sensorial de la bebida fermentada. En la Tabla 9, se presentan los resultados de la prueba de aceptación por parte de los jueces, en valores promedio.

Tabla 9. Aceptabilidad de la bebida fermentada según prueba hedónica (n = 80 Jueces).

Tiempo de conservación (día)	Puntuación	Calificación
1	1,6	Me gusta
7	1,9	Me gusta
14	1,9	Me gusta
21	1,9	Me gusta

Este análisis, arrojó que la bebida recibió la calificación de "Me gusta" y mantuvo esa aceptación durante el período de conservación durante los 21 días.

La bebida tuvo un nivel de aceptación bueno, obteniendo el calificativo de "Me gusta", durante los 21 días de conservación.

En el análisis sensorial, no se presentaron diferencias estadísticamente significativas, a un nivel de confianza del 95%.

La bebida desarrollada es una buena alternativa de uso del suero en la alimentación humana, debido a su gran valor nutricional, sobre todo, si se tiene en cuenta que, en Colombia, los niveles de desnutrición, sobrepasan el 30% de la población infantil.

El costo de la bebida elaborada fue de \$91,94/kg, a Junio de 2007, comparado con el de las bebidas ofrecidas en el mercado, el cual está fluctuando entre \$1.100/kg y \$1.500/kg, bebidas que contienen un 40% de suero y un 60% de leche. Con relación al precio de venta en el mercado, éstas llegan al consumidor final a valores que fluctúan entre \$2.000 y \$2.500 por kg (Precio del dólar \$2000).

RECOMENDACIONES

Se sugiere llevar a cabo análisis de sinergismo entre los microorganismos que se empleen en la elaboración de productos similares, con el fin de evitar un antagonismo y competencia entre ellos, que puedan ocasionar graves problemas en los productos o incrementar los costos de producción.

Se debe resaltar que a estos costos primos de \$91,94/kg, se le deben agregar los otros costos, que representan aproximadamente un 65% de los costos primos (\$145/kg).

Se sugiere realizar estudios de antagonismo de los cultivos utilizados frente a microorganismos patógenos.

CONCLUSIONES

La composición físico – química de la bebida, almacenada a 4°C, no tuvo una variación significativa durante el período de 21 días de conservación.

BIBLIOGRAFIA

Los microorganismos permanecieron viables en la bebida, almacenada a 4°C, durante los 21 días de vida de anaquel, obteniendo valores superiores a 10^6 ufc·g⁻¹.

AGROCADENAS. 2007. Observatorio Agrocadenas Colombia. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural e IICA. En: <http://www.agrocadenas.gov.co>. Consulta: Enero de 2008.

- AOAC. 1990. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 15ª ed. Ed. Helrich, K.; Arlington, VA. New York, USA.
- Arenas, B.H. 1997. Evaluación de la viabilidad del bifidobacterium en leche acidófila durante 21 días. Medellín, Trabajo de grado Zootecnista. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. 111 p.
- Dave, R.I. and N.P. Shah. 1998. Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yogurt. J. Dairy Sci. 81(11): 2804-2816.
- Federación Colombiana de Ganaderos – FEDEGAN. 2006. Nuevo sistema de pago de leche cruda. En: http://portal.fedegan.org.co/portal/page?_pageid=93,1&_dad=portal&_schema=PORTAL.2006. Consulta: Marzo de 2007.
- Franco, P.P. 1987. La naranja como saborizante en leches procesadas. Trabajo de grado Zootecnia. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia. Medellín. 62 p.
- Goldin, B.R., S.L. Gorbach, M. Saxelin, S. Barakat, L. Gualtieri and S. Salminen. 1992. Survival of lactobacillus species (Strain GG) in human gastrointestinal tract. Dig. Dis. Sci. 37(1):121-128.
- Gómez, R., G.H. González, A.I. Mejía y A. Ramírez. 1999. Proceso biotecnológico para la obtención de una bebida refrescante y nutritiva. Inter ciencia 24(2):205-210.
- Gonzalez, J.I., C. Romero y S. Jimenez. 1994. Control de calidad en la fabricación del yogur. Aliment. Equipos Tecnol. 13(6):77-81.
- Haines, H. 2000. Probiotics: positive actinobacteria delivered through dairy foods. En: <http://www.nutraceuticals.com/apr002.htm>.Consulta: Noviembre 2007.
- Health Professionals. 2000. Probiotics – friendly bacteria with a host of benefits. En: http://www.dairycountilofca.org/hp/hp_pbio.htm. Consulta: Enero 2008.
- Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. 1987. Yogurt, kumis y leche saborizada. Normas Técnicas Colombianas - NTC ICONTEC 777/73, 805/73 y 1419/77. 5 p.
- Instituto de Nutrición y Tecnología de alimentos. INTA. 2007. ¿Qué son los probióticos?. En: <http://www.inta.cl/consumidor/probioticos.htm>. Consulta: Octubre 2007.
- Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos–INVIMA. 1998. Manual de Procedimientos. Ministerio de la Protección Social, República de Colombia.
- Jaramillo, M., L.G. Mejía, y J.U. Sepúlveda. 1996. Principios de procesamiento y control de calidad de leches. Universidad Nacional de Colombia, Medellín. 144 p.
- Londoño, M.M. y B.N. Marciales. 1999. Viabilidad del cultivo láctico en la elaboración de una bebida fermentada utilizando suero de queso fresco. Tesis Especialización en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Colombia. Medellín. 91 p.
- Ministerio de Salud, República de Colombia. Resolución Número 02310 de 1986 (24 de Febrero de 1986).
- Paz Frassino, M.T. Seminario – Taller utilización del lactosuero de quesería. Santafé de Bogotá, Colombia; Abril 11, 12 y 13 de 2000. C.D.P.A., CENTIA e ICTA. 33 p.
- Peña, C.M. e I.E. Flórez. 2001. Utilización del lactosuero de queso fresco en la elaboración de una bebida fermentada, con adición de pulpa de maracuyá (*Passifloras edulis*) y diferentes mezclas de carboximetilcelulosa (CMC), enriquecida con vitaminas A y D. Trabajo de grado. Ingeniería Agrícola y de Alimentos. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Colombia, Medellín. 180 p.
- Rasic, Jeremija Lj. and J.A. Kurmann. 1978. Yoghurt. Staempfli, Belgrado. 427 p.
- Salazar, B.C. 2003. Aislamiento de cepas nativas de probióticos y comparación de la viabilidad por efecto de un probiótico. Medellín, 77 p. Tesis Maestría en Biotecnología. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias.
- Tamime, A.Y. and R.K. Robinson.1988. Fermented milks and their future trends: II. Technological aspects. J. Dairy Res. 55():281-307.
- Watts, B.M. 1992. Métodos sensoriales básicos para la evaluación de alimentos. CIID, Ottawa, Canadá: 170 p.