



Instituto Tecnológico Superior de Acatlán de Osorio

SEP

SEIT

TecNM

DIVISIÓN DE LA CARRERA DE INGENIERÍA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

OPCIÓN

“Tesis”

Proyecto

“Elaboración de yogurt afluado a partir de una fermentación que emplea como estabilizante un agente gelificante”

Que para obtener el título de:

Ingeniero en Industrias Alimentarias

Presenta

Oliver Guzmán Martínez

140512023

Acatlán de Osorio, Pue., Noviembre del 2020

AGRADECIMIENTOS

A Dios por ayudarme a mantener la Fe, por haberme brindado la oportunidad de vivir y con ello compartir mi vida con las personas que me rodean, así como por ayudarme a cumplir una de mis metas.

Al Instituto Tecnológico Superior de Acatlán de Osorio, especialmente a la carrera de Ingeniera en Industrias Alimentarias, por haberme brindado la oportunidad y las herramientas necesarias para mi formación profesional.

A mis maestros, ya que, sin sus consejos y enseñanzas, no hubiese sido posible lograr este objetivo.

Al Dr. Raúl Salas Coronado por sus valiosos consejos, enseñanzas y su apoyo incondicional durante el desarrollo de la investigación en la Universidad Tecnológica de la Mixteca.

A la Dra. Norma Francenia Santos Sánchez por su amistad sincera y compartir experiencias y conocimientos durante el desarrollo de esta investigación.

A la Dra. Beatriz Hernández Carlos por su apoyo en esta investigación y por los consejos brindados durante la misma.

A mi amiga y colega Angélica López Luis que, gracias a sus consejos, enseñanzas, y experiencias compartidas se pudo obtener un mejor resultado en el desarrollo de la presente investigación.

Al M.C. Víctor I. Pacheco Contreras por su amistad sincera y al mismo tiempo darme la oportunidad de realizar esta investigación y el apoyo incondicional para la realización de la misma.

A la Ing. Gabriela Fortunata Lara Ruiz por sus consejos y enseñanzas durante el proceso de mi desarrollo académico.

A la Universalidad Tecnológica de la Mixteca, por haberme permitido llevar a cabo el desarrollo de mi tesis en el instituto de Agroindustrias y del laboratorio de principios Bioactivos.

DEDICATORIAS

A mis padres

Mario Guzmán Maceda y Yaneth Martínez Andrade con todo mi Amor, humildad y respeto, a quienes les debo esta hermosa experiencia de existir, que, con su esfuerzo, confianza y ese gran espíritu de lucha, han sabido infundir en mí el valor de la humildad, respeto y seguridad.

A mis hermanos

Ederth José Guzmán Martínez y Rosita Guzmán Martínez quien en todo momento me han brindado su apoyo, cariño y sus sabios consejos para ser mejor día con día en este viaje llamado vida, a la misma vez agradecer a mi cuñada Lisbeth López Rivera por su amistad sincera, consejos y enseñanzas brindadas y por último a mi sobrino José Ángel Guzmán López por enseñarme que la vida se vive mejor día a día con una sonrisa.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS.....	III
DEDICATORIAS.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS	X
ÍNDICE DE TABLAS.....	XI
RESUMEN.....	XII
ABSTRACT	XIII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1 Objetivo general	3
2.2 Objetivos específicos.....	3
2.3 Hipótesis	3
3. REVISIÓN DE LITERATURA	4
3.1 Historia de la fermentación.....	4
3.2 Definición de fermentación	5
3.3 Proceso de fermentación.....	6
3.4 Microorganismos iniciadores	7
3.5 Fermentación homoláctica.....	8
3.6 Coagulación de leche durante el proceso de fermentación.....	10
3.7 El yogurt como un producto lácteo fermentado	12
3.8 Definición de yogurt.....	13
3.9 Tipos de yogurt.....	14
3.9.1 Basado en composición química	15
3.9.2 Yogurt con un contenido de grasa alto	16
3.9.3 Yogurt parcialmente desnatado	16
3.9.4 Yogurt desnatado o yogurt bajo en grasa	16
3.9.5 Yogurt natural.....	16
3.9.6 Yogurt agitado	17
3.9.7 Yogurt caliente	17
3.9.8 Yogurt congelado	18
3.9.9 Yogurt seco.....	18
3.9.10 Yogurt endulzado	19
3.9.11 Yogurt probiótico y simbiótico.....	19
3.10 Producción de yogurt.....	20

3.11 Almacenamiento del yogurt.....	21
3.12 Fibra dietética en el yogurt	21
3.13 Importancia de la pectina en el yogurt.....	25
3.13.1 Pectina y calidad de los alimentos.....	26
3.13.2 Importancia de las pectinas en productos lácteos.....	27
3.13.3 Pectinas como estabilizadores	28
3.14 Gellan.....	29
3.14.1 Importancia del gellan en la industria.....	30
3.15 Importancia de los análisis proximales.....	31
3.15.1 Contenido de humedad en el yogurt	31
3.15.2 Contenido de proteína en yogurt	32
3.15.3 Métodos de cuantificación de proteína.....	33
3.15.3.1 Absorbancia ultravioleta (UV) a 280 nm	33
3.15.3.2 Ácido bicinconínico (BCA) o ensayo basado en cobre.....	33
3.15.3.3 Ensayo de Bradford o azul brillante de Coomassie.....	34
3.15.3.4 Ensayo de Lowry para cuantificar proteínas	35
3.15.4 Contenido de grasa en yogurt	35
3.15.4.1 Cuantificación de grasa total	36
3.15.4.2 Cuantificación de grasa por el método de Gerber	37
3.15.5 Lactosa en yogurt.....	37
3.15.5.1 Fermentación de lactosa en el yogurt	38
3.15.5.2 Efecto de la lactosa en el yogurt.....	39
3.15.6 Acidez titulable en yogurt.....	40
3.15.7 Contenido de cenizas en el yogurt.....	41
3.15.8 El pH en el yogurt.....	42
4. ORIGINALIDAD.....	44
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	45
5.1 Materiales utilizados en la experimentación	45
5.2 Reactivos	45
5.3 Procedimiento general de elaboración de yogurt	46
5.4 Determinación de pH.....	47
5.5 Determinación de Humedad	47
5.6 Cuantificación de cenizas	48
5.7 Cuantificación de grasas.....	49

5.8 Acidez titulable.....	50
5.8.1 Valoración de NaOH 0.1N	50
5.8.2 Determinación de acidez titulable en muestras de yogurt	50
5.9 Cuantificación de proteína por el método de Biuret.....	51
5.9.1 Elaboración de la curva de calibración para la determinación de proteína	51
5.10 Cuantificación de carbohidratos	52
5.11 Análisis estadístico	53
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	54
6.1 Elaboración y fermentación de yogurt afluado utilizando como agentes estabilizantes pectina de tempesquistle, pectina comercial y gellan	54
.....	54
6.2 Determinación de pH y acidez titulable	55
6.3 Cuantificación de cenizas por el método de la AOAC 923.03	59
6.4 Cuantificación de grasas por el método de Gerber.....	60
.....	62
.....	62
6.5 Determinación de Proteína por el método colorimétrico de Biuret.....	62
6.6 Determinación de Carbohidratos por el método colorimétrico Somogyi-Nelson	64
7. CONCLUSIÓN	66
8. BIBLIOGRAFÍA	67
9. APÉNDICES	71
Apéndice 1. Diagrama de proceso para la elaboración de yogurt	71
Apéndice 2. Determinación de humedad.....	72
Apéndice 3. Cuantificación de cenizas	73
Apéndice 4. Determinación de acidez titulable	74
Apéndice 5. Determinación de grasa por el método de Gerber.....	75
Apéndice 6. Cuantificación de proteínas por el método de Biuret.....	76
Apéndice 7. Preparación del reactivo de trabajo de Biuret.	77
Apéndice 8. Determinación de carbohidratos por el método de Somogy-Nelson.....	78
.....	78
Apéndice 9. Preparación del reactivo de Nelson	79
Apéndice 10. Preparación del reactivo de Somogyi.....	80
.....	80
Apéndice 11. Obtención de yogurt en un intervalo de pH de 4.2-4.5.	81

Apéndice 12. Curva de calibración para la determinación de proteína por el método de Biuret.	82
Apéndice 13. Curva de calibración para la determinación de carbohidratos por el método de Somogyi-Nelson.	83

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama con la representación de algunos cambios físicos ocurriendo en las micelas de caseína durante la acidificación de la leche.	11
Figura 2. Obtención de yogurt a partir de una fermentación láctica con Gellan como agente gelificante.....	54
Figura 3. Monitoreo del pH para evaluar la evolución del proceso de fermentación.	57
Figura 4. Evaluación del pH en función del tiempo del proceso de fermentación de los cinco tratamientos estudiados.....	57
Figura 5. Carbonización de muestra de yogurt.	59
Figura 6. Muestra de yogurt después de la calcinación en mufla a 550 °C.	59
Figura 7. Adición de ácido sulfúrico concentrado al 91 % a la muestra de yogurt para la determinación de grasa por el método de Gerber.	61
Figura 8. Resultado final de la determinación de grasa en el butirómetro de la muestra de yogurt aplanado de pectina de tempesquistle con gellan.....	62
Figura 9. Esquema de la reacción de Biuret (Krohn, 2002).	63
Figura 10. Determinación de proteínas por el método de Biuret de los 5 tratamientos realizados. Cada tratamiento se realizó por triplicado con su respectivo blanco.	63

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Clasificación general de los yogurts (Behare, Kumar, & Mandal, 2016).</i>	15
Tabla 2. <i>Concentraciones de agentes gelificante utilizados en cada uno de los tratamientos.</i>	47
Tabla 3. <i>Resultados de análisis fisicoquímicos de los diferentes tratamientos de yogurt.</i>	55
Tabla 4. <i>Resultados de análisis proximales de los diferentes tratamientos de yogurt.</i>	55

RESUMEN

El yogurt es una de las bebidas lácteas más importantes en el mundo debido a su contenido alto en proteínas, grasas, azúcares y microorganismos, además es considerado como un alimento probiótico. Sin embargo, el yogurt también se ha asociado con un incremento de peso en los consumidores por su contenido alto en grasas. Además, la lactosa, el azúcar presente en la leche algunas veces provoca problemas digestivos. Por lo tanto, se vuelve importante producir un yogurt bajo en grasas y en lactosa. Cabe señalar que en el mercado existen productos que son bajos en grasas, pero contienen almidones como agente estabilizante principalmente, los cuales contribuyen al aporte calórico de la bebida al consumidor. Por tal motivo, el objetivo del presente trabajo consistió en obtener un yogurt afluado con un mínimo contenido de grasas y libre de almidones, empleando como agente estabilizante una pectina proveniente del fruto de tempesquistle verde. También se empleó el gellan, un agente gelificante. Para la determinación proximal de los yogures elaborados se realizaron determinación fisicoquímicos como acidez, pH, humedad, cenizas estos bajo las metodologías aplicadas por la AOAC, en la determinación de grasas se realizó por el método de Gerber y en el caso de cuantificación de proteínas se realizó por el método de Biuret y carbohidratos por el método de Somogyi-Nelson se utilizaron métodos colorímetros en microplaca. Los resultados del estudio muestran que el yogurt adicionado con pectina de tempesquistle y gellan mostraron la mayor estabilidad respecto al resto de los tratamientos; sin embargo, los dos tratamientos donde se empleó pectina de tempesquistle, también mostraron un contenido mayor de proteínas. En futuros trabajos se recomienda realizar la digestibilidad *in vitro* para evaluar su bioaccesibilidad

ABSTRACT

Yogurt is one of the most important dairy drinks in the world due to its high content of proteins, fats, sugars and microorganisms that are considered a probiotic food. However, yogurt has also been associated with weight gain in consumers due to its high fat content. In addition, lactose, the sugar in milk sometimes causes digestive problems. Therefore, it becomes important to produce a low fat and lactose yogurt. It should be noted that there are products on the market that are low in fat, but mainly contain starches as a stabilizing agent, which contribute to the caloric intake of the drink to the consumer. For this reason, the objective of this work was to obtain a flattened yogurt with a minimum fat content and free of starches, using a pectin from the green tempesquistle fruit as a stabilizing agent. Gellan, a gelling agent, was also used. For the proximal determination of the elaborated yogurts, physicochemical determinations such as acidity, pH, humidity, ashes were carried out under the methodologies applied by the AOAC, in the determination of fats it was carried out by the Gerber method and in the case of protein quantification, carried out by the Biuret method and carbohydrates by the Somogyi-Nelson method, microplate colorimeter methods were used. The results of the study show that the yogurt added with tempesquistle pectin and gellan showed the highest stability compared to other treatments evaluated, however in the two treatments prepared with tempesquistle pectin also showed a high protein content. For future works, it is recommended to perform *in vitro* digestibility to evaluate its bioaccessibilit.

1. INTRODUCCIÓN

La leche fresca de bovino se compone en promedio de 3.7 % de grasa, 5 % de lactosa, 3.3 % de proteínas, una actividad de agua cerca de 1.0 y un pH casi neutro, en un intervalo de 6.6-6.7. En ausencia del proceso de fermentación y las bacterias productoras de ácido láctico, los microorganismos patógenos sobreviven en la leche y causan el deterioro de la leche. El consumo de bebidas tradicionales de la leche fermentada como *lavan rayed* y *lavan khad* se remontan al año 7000 a. C, precursores del yogurt moderno (Das, Choudhary, & Thompson-witrick, 2019).

En el proceso comercial de yogurt se utiliza una mezcla indefinida de bacterias ácido lácticas. Sin embargo, otros productos también pueden requerir una mezcla diferente, por ejemplo, el suero de mantequilla búlgaro. La importancia de seleccionar cultivos iniciadores utilizados durante la etapa de fermentación se debe a que se busca un sabor deseable del producto, principalmente lactato, compuestos aromáticos (acetaldehído, acetoina y diacetil) y exopolisacáridos (EPS). El resultado de la actividad microbiana es un aumento de acidez, alcanzando una concentración de ácido láctico de 1.0-1.2 % y un pH de 4.2-4.3. Bajo estas condiciones, las proteínas sufren una coagulación y forman un gel firme (Ye, Singh, Oldfield, & Anema, 2004). En el mercado existen diferentes tipos de yogures que van desde yogures con contenidos altos en grasas, bajos en grasa (dietéticos), yogures adicionados con estabilizadores comerciales o almidones modificados. Estos últimos productos tienen como objetivo suplir el contenido alto de grasa en el yogurt. Cabe señalar que cada vez es mayor la demanda de yogures dietéticos y cobra relevancia realizar estudios relacionados con estos productos.

Por tal motivo, el objetivo del presente trabajo fue elaborar un yogurt afluado con un contenido bajo en grasa y carbohidratos (dietético). Para desarrollar el producto se propusieron dos agentes estabilizadores, pectina de tempesquistle (de bajo grado de esterificación) y pectina comercial (de alto grado de esterificación). Estas pectinas fueron empleadas solas y también combinadas con otro agente gelificante llamado gellan. Esto con la finalidad de evaluar la formación de un gel estable y deseable en el yogurt. Esta investigación implicó realizar análisis bromatológicos a los productos obtenidos en los cinco tratamientos realizados. Los análisis se llevaron a cabo por métodos fisicoquímicos tal como la determinación de acidez al final del proceso de fermentación y la medición de pH para dar seguimiento al proceso de fermentación. También se llevó a cabo la determinación de humedad, contenido de cenizas y grasas. La cuantificación de grasas se llevó a cabo por el método de Gerber. La determinación de proteínas se realizó por el método de Biuret y la determinación de carbohidratos por el método de Somogyi-Nelson. Estos dos últimos métodos son colorimétricos y se realizaron en microplaca.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Obtener un yogurt aflanado, bajo en grasas, empleando como agente gelificante pectina de tempesquistle y gellan.

2.2 Objetivos específicos

- Obtener pectina a partir de frutos verdes de tempesquistle.
- Realizar el proceso de fermentación de leche en presencia de microorganismos promotores de la producción de yogurt y el agente gelificante.
- Determinar la composición proximal del yogurt.
- Identificar el producto con las mejores propiedades de composición y estabilidad.

2.3 Hipótesis

El empleo de pectina combinada con gellan durante el proceso de producción de yogurt aflanado a una temperatura de 43 °C permite la obtención de una emulsión estable con un contenido de lactosa bajo a un pH final de 4.5.

3. REVISIÓN DE LITERATURA

En la presente sección se describen los antecedentes del proceso de producción del yogurt, incluyendo la presencia de aditivos y los microorganismos comúnmente utilizados, así como el impacto que tiene la pectina en las propiedades físicas del producto. Siendo el pH, la acidez titulable y el contenido en proteínas y grasas las características más importantes en las bebidas lácteas (Lucas-gonzález, Viuda-martos, Pérez-alvarez, & Fernández-lópez, 2018), se describen también los métodos para su cuantificación

3.1 Historia de la fermentación

La fermentación para la conservación de la leche fue utilizada por los humanos por primera vez, aunque no se cuenta con registro del origen de los productos lácteos fermentados, en el medio oriente antes de la era fenicia. En Egipto, el consumo de bebidas tradicionales de la leche fermentada como *lavan rayed* y *lavan khad* se remontan al año 7000 a.C. Los Vedas, alrededor del año 5000 a.C., desarrollaron un producto fermentado parecido al yogurt moderno llamado *dadhi*, que se le atribuían propiedades terapéuticas y aún sigue siendo un componente crucial en la dieta en el sur de Asia. Este yogurt es producido en la mayoría de los hogares indios. Se cree que la palabra yogurt fue utilizada por primera vez por los turcos en el siglo VIII. Sin embargo, existe otra teoría que indica que el yogurt fue preparado por primera vez en los balcanes. La leche agria, *prokish*, fue preparada a partir de leche de oveja por campesinos de Tracia.

Las regiones del sur de Asia (India, Pakistán, Nepal y Bangladesh), así como en las regiones del suroeste de Asia (Irán, Balcanes, Turquía y Siria) se encuentran entre los principales productores y consumidores de productos lácteos fermentados. También se cree que la

invasión de mongoles, tártaros y otros grupos étnicos asiáticos de Rusia y Europa contribuyeron a la propagación del yogurt y la leche fermentada en otras partes del mundo. El yogurt es ahora un producto muy popular y una parte importante de la dieta en Europa, Australia, América y en otras partes del mundo (Chandan, Gandhi, & Shah, 2017).

La leche fermentada es uno de los alimentos fermentados más antiguos. La leche obtenida de vacas, camellos o cabras domésticas hace miles de años se fermentaba por bacterias endógenas de ácido láctico en un periodo de varias horas, obteniendo como resultado un producto similar al yogurt. Antes de la invención de la refrigeración a mediados de la década de 1830, era extremadamente difícil evitar que la leche fresca se deteriorara o cuajara especialmente en ambientes cálidos. La leche fresca de bovinos se compone en promedio de 3.7 % de grasa, 5 % de lactosa, 3.3 % de proteína y una actividad de agua cerca de 1.0 y un nivel de pH casi neutro de 6.6-6.7, sin el proceso de fermentación y las bacterias productoras de ácido, los microorganismos patógenos sobreviven en la leche y causan deterioro (Das, Choudhary, & Thompson-Witrick, 2019).

3.2 Definición de fermentación

Las Normas Alimentarias Internacionales publicadas por el Codex Alimentarius de la Organización de la Naciones Unidas para la Alimentación/Organización Mundial de la Salud (FAO/OMS, por sus siglas en inglés) señalan que la leche fermentada es un producto lácteo obtenido por la fermentación de la leche, que puede ser fabricado a partir de productos obtenidos de la leche con o sin modificación de la composición por la acción de microorganismos adecuados y que resulta en la reducción de pH con o sin coagulación-precipitación isoeléctrica. Estos microorganismos iniciadores deben ser viables, activos y abundantes en el producto hasta la fecha de durabilidad mínima. Si el producto se trata con

calor después de la fermentación, no se aplica el requisito de microorganismos viables. Los productos lácteos fermentados se preparan a partir de leche o crema pasteurizada, a veces enriquecida con leche desnatada en polvo y agregada con otros ingredientes, como aromatizantes, espesantes y otras preparaciones de frutas. Así como acidificada por bacterias de ácido láctico que dan como resultado un producto con consistencia y textura típicas. Todas las leches acidificadas tienen como característica común la presencia de ácido láctico resultante de la fermentación de lactosa por diversas combinaciones de bacterias mesófilas y termófilas que promueven la coagulación de la proteína de la leche (Oliveira & Paulo, 2014).

3.3 Proceso de fermentación

Durante la fabricación del yogurt, la leche tratada térmicamente se enfría a la temperatura de incubación del cultivo iniciador (*S. thermophilus* y *L. delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*) y, posteriormente, la leche se fermenta a 40 ± 5 °C, es decir, a la condición óptima de crecimiento para el cultivo mixto. En algunos casos, el período de incubación puede ser tan corto como 6 h, suponiendo que el cultivo iniciador (3%) esté activo y que la relación entre las bacterias iniciadoras esté bien equilibrada. Sin embargo, se puede usar el método de incubación más largo (es decir, durante la noche) y las condiciones de incubación son 30 °C durante aproximadamente 16 ± 8 h, o hasta que se alcance la acidez deseada (Rodgers, 2001). Los yogurts producidos a 38 °C tienden a obtener puntajes más altos. La temperatura de incubación puede llegar a afectar la característica distintiva del gel de yogurt. Si la fermentación típica para el yogurt se lleva a cabo a una temperatura de 42 °C, el uso de una temperatura de incubación más baja conducirá a un tiempo de gelificación ligeramente más largo, pero esto tiene como ventajas (a) un producto más firme y viscoso, (b) el gel es menos propenso a la sinéresis y/o (c) un menor número de grumos/gránulos al agitar el coágulo

durante la etapa de enfriamiento (Lee & Lucey, 2003). A una temperatura de incubación más baja, las partículas de caseína aumentan de tamaño debido a una reducción en las interacciones hidrofóbicas que, a su vez, aumenta el área de contacto entre las partículas de caseína (Lee & Lucey, 2003). Una tendencia similar ocurre cuando los geles se enfrían. Una temperatura de incubación alta también hace que la red de gel sea más propensa a reordenamientos, y estos cambios pueden conducir a una mayor separación del suero (Mellema, Walstra, Van Opheusden, & Van Vliet, 2002). Como desventajas se tiene que las temperaturas de fermentación más bajas pueden dar como resultado una disminución en la producción de componentes de sabor por parte de los cultivos iniciadores.

3.4 Microorganismos iniciadores

El proceso comercial de fabricación de yogurt utiliza una mezcla definida de bacterias ácido lácticas, por ejemplo, *S. thermophilus* y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, pero otros productos pueden requerir una mezcla diferente. Por ejemplo, el suero de mantequilla búlgaro se produce utilizando únicamente *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, mientras que el dahi en la India se produce utilizando un cultivo iniciador mixto que contiene *S. thermophilus*, *Lactococcus lactis* biovar *diacetylactis* y *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (Surono, 2003). Las razones para seleccionar las combinaciones de cultivos iniciadores utilizados durante la fabricación de yogurt son lograr las características de sabor deseadas del producto, principalmente atribuidas al lactato, los compuestos aromáticos (acetaldehído, acetoína y diacetil) y los exopolisacáridos (EPS).

Aunque las cepas de bajo sabor tienden a clasificarse como productoras con un contenido alto de EPS, el mismo patrón puede surgir organolépticamente porque la presencia de EPS

en un yogurt puede enmascarar el sabor del producto; dichos productos también tendrán una sensación en la boca diferente (Marshall & Gallardo, 1993).

El enfoque actual para el desarrollo del cultivo iniciador requiere detección, caracterización, verificación de su seguridad para el uso humano, verificación de su eficiencia en modelos animales y en estudios clínicos en humanos (Fernández, Boris, & Barbés, 2005).

3.5 Fermentación homoláctica

En general, los cultivos iniciadores de productos lácteos fermentados metabolizan los carbohidratos (es decir, la lactosa, el azúcar principal presente en la leche) a través de las vías metabólicas homo- o heterofermentativas. Las bacterias *S. thermophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Lactobacillus acidophilus* fermentan la lactosa homofermentativamente, mientras que las *Bifidobacterium* spp., fermentan el mismo azúcar heterofermentativamente. Debido a que el presente estudio involucra a las bacterias productoras de yogurt se describe la fermentación homoláctica.

El catabolismo de la lactosa tiene lugar dentro de la célula microbiana, el paso clave en esta ruta metabólica es la entrada de la lactosa en la célula. En los *lactococos* y ciertas cepas de *Lactobacillus acidophilus* (Kanatani & Oshimura, 1994)(A. Y. Tamime & Marshall, 1997) está involucrado un sistema específico en el transporte de lactosa y el azúcar se fosforila a partir de la reacción con fosfoenolpiruvato (FEP) durante la translocación por el sistema fosfotransferasa (SFT) dependiente del FEP (Lawrence, Thomas, & Terzaghi, 1976). Este mecanismo se conoce como FEP:SFT y cuatro proteínas (en orden secuencial: enzimas II, III, I y HPr) están involucradas en la translocación de la lactosa desde afuera hacia adentro de la membrana citoplasmática y dentro de la célula microbiana para convertirse en fosfato de lactosa (AY Tamime, 2006). Posteriormente, la lactosa-6-fosfato es hidrolizada por la

fosfogalactosidasa (-Fgal) en sus componentes monosacáridos. La galactosa y la glucosa se catabolizan a través de las vías Tagatose y Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), respectivamente (AY Tamime, 2006). Sin embargo, la desfosforilación de galactosa puede tener lugar y permanecerá sin metabolizar y se excretará de la célula microbiana. En ambas vías, la glucosa y la galactosa convergen en dihidroxiacetona fosfato y gliceraldehído-3-fosfato, donde los azúcares de tres carbonos se oxidan hasta fosfoenolpiruvato y posteriormente producen ácido láctico.

La fermentación homoláctica por *S. thermophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *L. acidophilus* sigue la vía EMP principalmente para el catabolismo de la glucosa. Sin embargo, existe un sistema alternativo para el transporte de lactosa a las células de estos cultivos iniciadores, que involucra proteínas citoplasmáticas (permeasas) que translocan la lactosa sin modificación química. Después de que la lactosa ingresa a la célula a través de una permeasa como un disacárido no fosforilado, es hidrolizada por la β -galactosidasa (β -gal) a glucosa y galactosa no fosforiladas. La glucosa se cataboliza a piruvato y la galactosa es secretada por la célula. Cuando se agota toda la glucosa, *S. thermophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *L. acidophilus* utilizarán la galactosa a través de la vía Leloir con galactoquinasa como la primera enzima de la vía metabólica (Poolman & Knol, 1999). Sin embargo, (Cogan & Hill, 1993) sugieren que algunas cepas pueden metabolizar la galactosa solo cuando están presentes concentraciones bajas de lactosa (4 mM).

3.6 Coagulación de leche durante el proceso de fermentación

El resultado de la actividad microbiana es un aumento de la acidez de la leche hasta alcanzar una concentración de ácido láctico de 1.0-1.2 % (alrededor de pH 4.2–4.3) después de 3-4 h de fermentación. Con esta acidez (que es probablemente el nivel máximo aceptable para los consumidores de yogurt de frutas agitado en Occidente), las proteínas de la leche se habrán coagulado para formar un gel firme (Ye, Singh, Oldfield, & Anema, 2004). La producción de ácido láctico da como resultado una reducción en la carga superficial (potencial zeta) de la micela de caseína desde la carga negativa neta originalmente alta a pH 6.7 hasta casi sin carga neta cerca del punto isoeléctrico de la caseína (pH 4.6) (Figura 1). Este cambio en la carga superficial permite que las micelas de caseína se agreguen a través de enlaces hidrofóbicos y electrostáticos. La repulsión estérica permanece en los "filamentos" del macropéptido de caseína, aunque estos pueden llegar a "enrollarse" un poco a medida que el pH disminuye. La agregación de las partículas de caseína da como resultado que se forme un gel con un pH de ~ 5.3 en la leche tratada con calor, en comparación con ~ 5.0 en la leche sin calentar (Figura 1). Esta diferencia se debe a que la proteína principal del suero (β -lactoglobulina) tiene un punto isoeléctrico alto (pH ~ 5.3) y, como la mayoría de las proteínas de suero desnaturalizadas están asociadas con las micelas de caseína durante el calentamiento o la acidificación de la leche, consecuentemente la agregación y la gelificación se desplazan a valores de pH más alto. Estas nuevas partículas de proteína de caseína-suero son las que inician la gelificación, ya que se vuelven inestables. También es relevante que, a las temperaturas utilizadas para la fermentación del yogurt (es decir, temperaturas ≥ 30 °C), se

produce una pequeña disociación de las caseínas de las micelas durante la acidificación de la leche (Lucey & Singh, 2003).

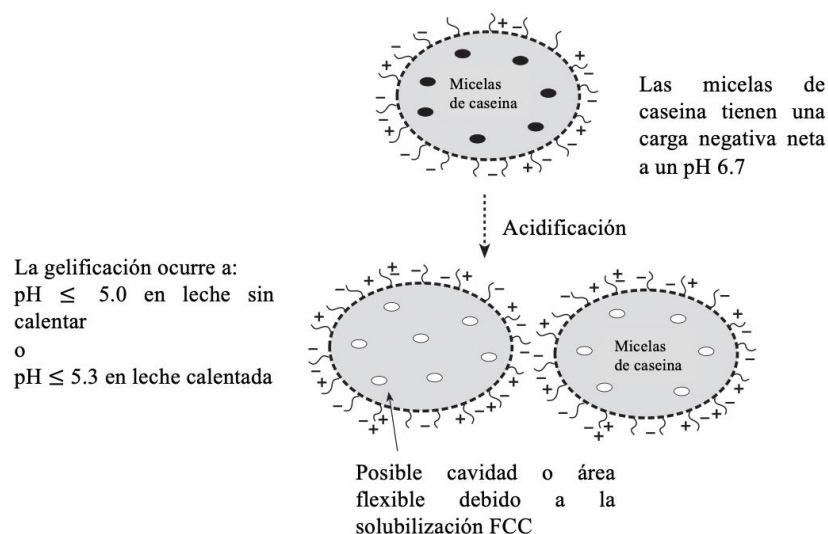


Figura 1. Diagrama con la representación de algunos cambios físicos ocurriendo en las micelas de caseína durante la acidificación de la leche.

El fosfato cálcico coloidal (FCC) desempeña un papel clave en la estabilidad de las micelas de caseína, ya que actúa como un puente neutralizante entre los grupos seril-fosfato cargados negativamente (Horne, 1999). La solubilización del FCC ocurre durante la acidificación, especialmente a un pH 6, y esto provoca un aumento en la repulsión electrostática entre los residuos de seril-fosfato expuestos (Lucey, 2002). Cuando la leche se acidifica lentamente, casi todo el FCC se disuelve a un pH de 5.1 y, dado que los geles de leche sin calentar no se forman hasta un pH de 5.0, las partículas de caseína empobrecidas por el FCC que forman la red de gel ácido son muy diferentes de las micelas de caseína originales.

Una situación muy diferente ocurre en geles ácidos hechos de leche calentada, ya que el punto de gelificación alto (pH 5.3) significa que parte del FCC continúa solubilizándose dentro de

las partículas de caseína después de que se ha formado la red inicial. Esta pérdida de FCC provoca un debilitamiento de la red y coincide con la aparición de suero en la superficie del gel. Las condiciones que fomentan este debilitamiento incluyen tratamientos de temperatura baja de la leche, temperaturas altas de incubación y niveles muy bajos de inóculo iniciador. Por debajo de un pH 5.0, la firmeza del gel aumenta considerablemente, y es máxima a un pH ~ 4.6, el pH isoelectrico de la caseína, y continúa aumentando con el tiempo. Además, el tratamiento térmico elevado de la base de la leche conduce a una gelificación más rápida y geles más firmes (Lee & Lucey, 2003).

La velocidad y el grado de solubilización de FCC durante el proceso de fermentación impactan en la textura de los productos cultivados. Para geles hechos a la misma temperatura de incubación, el uso de un nivel bajo de inóculo, por ejemplo 0.5 % (v/v), da como resultado un gel más débil que el uso de una concentración alta de inóculo, por ejemplo, 4 % (v/v) (Lee y Lucey, 2004). Probablemente, la acidificación más lenta proporciona más tiempo para la disolución del FCC, especialmente durante las primeras etapas de la gelificación. Las temperaturas bajas de incubación (por ejemplo, 38 °C) también producen tiempos de fermentación más largos, pero la firmeza de los geles es más alta y son más estables que los geles fabricados a temperaturas altas de incubación (por ejemplo, 45 °C). Las mejoras producidas por la incubación a temperatura baja se deben al aumento de la hinchazón de las moléculas de proteína y a las interacciones más fuertes entre las partículas de caseína.

3.7 El yogurt como un producto lácteo fermentado

El yogurt se obtiene a partir de la fermentación con los cultivos protosimbóticos *S. thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. La fermentación de la leche también se puede realizar con otras especies de bacterias ácido lácticas, tales como

Bifidobacterium sp., *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, y cualquier otra especie de *Lactobacillus* donde la actividad de los microorganismos determina las características del producto final. Estos productos no deben denominarse yogurt.

En el mercado de lácteos también se pueden encontrar leches fermentadas saborizadas, las cuales son productos lácteos combinados que contienen un máximo del 50% (m/m) de ingredientes no lácteos, como edulcorantes, frutas y verduras; así como jugos, purés, pulpas, preparaciones y conservas derivados de cereales, miel, chocolate, nueces, café, especias y otros saborizantes naturales. Los ingredientes no lácteos se pueden mezclar antes o después del proceso de fermentación.

Finalmente se encuentran las bebidas a base de leche fermentada. Estas bebidas son productos lácteos combinados obtenidos al mezclar leche fermentada con agua potable, con o sin la adición de otros ingredientes, como suero, otros ingredientes no lácteos y saborizantes. Las bebidas a base de leche fermentada deben contener un mínimo de 40% (m/m) de leche fermentada (Oliveira & Paulo, 2014).

3.8 Definición de yogurt

El yogurt es uno de los productos lácteos fermentados más populares, ampliamente consumidos en todo el mundo debido a sus propiedades organolépticas y nutricionales que son muy buscadas por los consumidores. El yogurt es obtenido por fermentación láctica de dos cepas específicas: *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. El producto terminado con o sin agitación debe incluir $\sim 10^7$ de estas bacterias vivas/mL. La textura es una característica fundamental del yogurt que no se puede mejorar mediante el uso de agentes gelificantes, espesantes o estabilizadores (Arioui, Saada, & Cheriguene, 2017).

El consumo de yogurt contribuye considerablemente a la ingesta de nutrientes como proteínas, vitaminas B2 y B12, y también ciertos minerales, principalmente calcio, magnesio y zinc. El beneficio de los derivados de la leche ha llevado a los fabricantes a producir una gama amplia de yogurts con diferentes sabores, texturas y consistencia en respuesta a las preferencias de los consumidores. El yogurt contiene niveles altos de proteína y se conocen como macronutrientes con la mayor capacidad de saciedad (Morell, Piqueras-fizman, Hernando, & Fizman, 2015).

3.9 Tipos de yogurt

El yogurt que se produce en todo el mundo se clasifica en función de la composición química, el método de producción y la formación de texturas, el uso de aditivos y cultivos especiales y en función de los tratamientos empleados después de la incubación. Respecto a la composición química, el contenido de grasa es crucial. Como tal, el yogurt se clasifica como yogurt desnatado, parcialmente descremado, alto en grasa o completo. El contenido de grasa se ajusta antes de administrar el tratamiento térmico a la leche. Con base en la textura, se producen dos tipos principales de yogurt el “aflonado” y el “batido”. También se puede realizar una preparación de un coctel de producto de tipo aflonado o batido al combinar diferentes variedades de yogurt (yogurt con sabor/fruta, fortificado, bajo en grasa, natural, endulzado y probiótico). Además, para mejorar la vida útil del yogurt, es necesario emplear procesos posteriores a la incubación y al producto obtenido se denomina yogurt calentado, congelado o seco.

Tabla 1. Clasificación general de los yogurts (Behare, Kumar, & Mandal, 2016).

Tipo de yogurt	Características generales	País
Alto en grasa	Contenido de grasa láctea en el yogurt desnatado no debe ser inferior a 3.0%. Rahmjoghurt es un tipo de yogur cremoso con toda la grasa, aproximadamente un 10%.	Alemania
Parcialmente desnatado	Contenido de grasa en el producto final no debe ser inferior al 0.5% ni superior al 3.0%.	India
Bajo en grasa	El contenido de grasa es muy bajo, es decir, inferior al 0.5%.	Todo el mundo
Natural	Tiene características gelatinosas con textura particular y no se usan aditivos.	India
Agitado	Tiene consistencia semisólida y generalmente se prepara por cizallamiento y el producto final no tiene textura de gel	Todo el mundo
Caliente	Uso de ciertos hidrocoloides (pectinas) tiende a separar el suero por tratamiento térmico.	Todo el mundo
Congelado	El producto final debe tener más del 3.25% de grasa de leche, 8.25% de sólidos de leche sin grasa y 0.15–0.30% de acidez titulable	Todo el mundo
Seco	Leche desnatada en polvo con contenido bajo de agua, crea condiciones desfavorables para el crecimiento de microorganismos patógenos como levaduras y mohos	Turquía
Endulzado	Se prepara mediante la adición de trozos de fruta, pulpa, jugo, pasta o jarabe aromatizado o extractos de especias a la leche antes de la fermentación	India y Camerún
Probiótico y simbiótico	Contienen ingredientes no digeribles que estimulan el crecimiento y el metabolismo de microorganismos beneficiosos	Todo el mundo

3.9.1 Basado en composición química

El Codex alimentarius ha mencionado tres tipos de yogurt en función del contenido de grasa de la leche ($\geq 8.25\%$), la acidez titulable ($\geq 0.9\%$) y el pH (≤ 4.5) permanecen casi similares para el yogurt descremado y parcialmente descremado.

3.9.2 Yogurt con un contenido de grasa alto

Este yogurt es preparado a partir de leche con un contenido de grasa alto. Según las normas, el contenido de grasa no debe ser inferior al 3.0% para el *Rahm joghurt*, el cual es un tipo de yogurt cremoso con toda la grasa. En Alemania, este yogurt contiene aproximadamente 10% de grasa.

3.9.3 Yogurt parcialmente desnatado

Es preparado a partir de leche que contiene niveles medios de grasa generalmente entre 0.5% y 3.0%, el producto final no debe ser inferior al 0.5% ni superior al 3%.

3.9.4 Yogurt desnatado o yogurt bajo en grasa

El contenido de grasa de este yogurt se encuentra por debajo del 0.5%. Este yogurt es muy popular en mercados de alimentos contemporáneos y existe una creciente demanda de dichos productos; sin embargo, el mal sabor, el cuerpo y la textura y más sinéresis son los principales problemas encontrados durante la producción de yogurt desnatado. Estos problemas pueden superarse parcialmente mediante un aumento en el contenido de sólidos totales provenientes de la leche mediante la adición de leche en polvo, concentrado de proteína de suero, caseinatos de sodio y calcio y otros ingredientes basados en proteínas de la leche antes de la fermentación, tales como las pectinas.

3.9.5 Yogurt natural

Este yogurt tiene una apariencia gelatinosa, adquirida durante el proceso de fermentación de la leche. Este proceso se lleva a cabo en tazas o recipientes y ahí permanece hasta su distribución o consumo. Las bacterias del yogurt, durante su actividad metabólica, convierten

la lactosa en ácido láctico y producen compuestos saborizantes como el acetaldehído y la 3-hidroxi-butanona durante la fermentación de la leche. Esto da como resultado final un sabor ácido suave.

3.9.6 Yogurt agitado

Tiene consistencia semisólida y generalmente se prepara por cizallamiento del yogurt formado. El producto final no tiene textura de gel debido al daño causado por la separación mecánica del suero, que se destaca mediante la suplementación de la leche desnatada en polvo y la adición de estabilizadores. Otra categoría es el yogurt para beber o líquido, que tiene una viscosidad baja.

3.9.7 Yogurt caliente

El yogurt natural almacenado a 4 °C proporciona una vida útil de 1 a 3 semanas, dependiendo de la calidad inicial (según el pH, la acidez titulable y los contaminantes microbianos presentes). Esto se debe al aumento de la acidez por las bacterias iniciadoras que continúan creciendo incluso a temperaturas bajas (post-acidificación), lo que resulta en un producto que es demasiado ácido. El deterioro también puede ocurrir debido al crecimiento de contaminantes fúngicos. Para aumentar la vida útil, el yogurt se puede calentar a 60–70 °C durante 1-5 min. El yogurt calentado se llama yogurt "pasteurizado", dependiendo de la combinación de tiempo/temperatura utilizada. Tal calentamiento extiende la vida útil del yogurt hasta 8 semanas. Sin embargo, el tratamiento con calor también aumenta la separación del suero, disminuye el sabor y destruye las bacterias iniciadoras del yogurt. Adicionalmente, crea complicaciones legales relacionadas con las regulaciones basadas en la definición de la FAO/OMS, que implica la presencia de organismos iniciadores viables en abundancia. El

uso de ciertos hidrocoloides, como pectinas, alginatos y carboximetilcelulosa, cuando se agrega al yogurt antes del tratamiento térmico, reduce la separación del suero y, hasta cierto punto, también el daño de las bacterias iniciadoras.

3.9.8 Yogurt congelado

Generalmente es preparado mezclando yogurt natural con una buena mezcla de crema, seguido de una congelación. La temperatura utilizada durante la congelación varía de -6 a -25 °C, debido a que no existen normas oficiales para el yogurt congelado. Sin embargo, en algunos países han especificado que el producto final debe tener más del 3.25 % de grasa de leche, 8.25 % de sólidos de leche sin grasa y 0.15-0.30 % de acidez titulable. La mezcla de helado de yogurt contiene hidrocoloides, emulsionantes, edulcorantes, sólidos sin grasa y sustitutos de grasa. El yogurt congelado bajo en calorías se produce mediante la adición de isomaltitol y fibras dietéticas solubles. La adición de un cultivo probiótico al yogurt congelado también permite mejorar sus propiedades biológicas, ya que le confiere beneficios a la salud, como un mejor control de las infecciones intestinales y la asimilación de lactosa. Sin embargo, se debe tomar en cuenta que estos cambios en la composición del yogurt pueden generar problemas asociados con la supervivencia de las bacterias iniciadoras y probióticas. También, la adición de edulcorantes a concentración alta puede llegar a ocasionar una disminución en el rendimiento bacteriano.

3.9.9 Yogurt seco

El yogurt seco se puede producir mediante secado al sol, secado al aire, secado por pulverización, liofilización o secado por microondas. El secado del yogurt provoca un contenido de agua bajo y crea condiciones desfavorables para el crecimiento microbiano que

causan su deterioro, especialmente levaduras y mohos. Sin embargo, el valor nutritivo del yogurt se degrada durante el proceso de concentración y el secado causa una pérdida de compuestos volátiles que afecta directamente el sabor del producto.

3.9.10 Yogurt endulzado

El yogurt endulzado es preparado mediante la adición de jarabe de azúcar, miel y jugo de caña para obtener un sabor dulce. Los yogures *Misti dahi Shrikhand* y *Kossam* son tipos populares de yogurt endulzado en India y Camerún, respectivamente. La caramelización del azúcar puede impartir un color marrón claro al producto final como en el caso de *Mistidahi*. Sin embargo, el contenido de azúcar alto en dichos productos también aumenta el contenido calórico y puede inhibir el crecimiento de los organismos iniciadores. En general, las cepas con tolerancia alta al azúcar se utilizan para producir productos lácteos fermentados endulzados. Se han realizados estudios para la reducción de calorías en estos productos reemplazando el azúcar con edulcorantes artificiales como el aspartame y el acesulfame-K.

3.9.11 Yogurt probiótico y simbiótico

De acuerdo con los estándares de la FAO/OMS, el yogurt es el producto lácteo coagulado obtenido por fermentación de ácido láctico a través de la acción de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*. Además, se tienen los cultivos complementarios y los cultivos probióticos que pertenecen a bacterias de los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Propionibacterium* y *Pediococcus*. El yogurt es un vehículo de uso frecuente y adecuado para la administración de bacterias probióticas, a menudo en forma potable. Los probióticos a veces se usan en combinación con prebióticos, lo que se conoce como un enfoque simbiótico. Los prebióticos son ingredientes alimenticios no

digeribles que estimulan selectivamente el crecimiento y el metabolismo de microorganismos beneficiosos, como los probióticos. Los prebióticos de uso común incluyen inulina, fructooligosacáridos y galactooligosacáridos (Behare et al., 2016).

3.10 Producción de yogurt

La leche utilizada en la producción de yogurt debe ser de excelente calidad microbiológica, estar libre de sustancias inhibitoras del crecimiento de las bacterias empleadas en la producción del yogurt, ya que *S. thermophilus* es muy sensible a la penicilina y debe contener al menos 8.5% de sólidos sin grasa (SNF, por sus siglas en inglés). La consistencia y el aroma del yogurt se mejoran al aumentar los sólidos totales, ya sea al adicionar leche en polvo o al evaporar el agua. Sin embargo, también se pueden agregar estabilizadores para mejorar la viscosidad. La leche de yogurt generalmente se inocula con los cultivos iniciadores en una proporción del 2% al 3% y se incuba en un intervalo de temperatura de 40–45 °C. La acidez final se alcanza en un intervalo de tiempo de 3–4 h. Sin embargo, se puede usar un intervalo de temperatura más baja de 30–37 °C durante un período de tiempo más largo (7–8 h) para promover la producción de limo y prevenir la sobre-acidificación. Este limo regularmente corresponde a la producción de un exopolisacárido (EPS) del cultivo de *S. thermophilus* y proporciona una viscosidad adicional. El producto final debe tener un aspecto brillante, una textura suave y una consistencia parecida a la crema. Estas son las características que describen la reología del yogurt. La acidez del yogurt afecta la viscosidad, debido a que la velocidad de producción de ácido también afecta las características físicas del gel. Respecto a esto, es aceptable una velocidad de producción de ácido uniforme. El enfriamiento del yogurt es un punto crítico debido a que restringe el crecimiento del iniciador, ralentiza y detiene la actividad enzimática y previene la sobre acidificación. Durante el almacenamiento

del yogurt la temperatura debe estar por debajo de 10 °C. El yogurt agitado puede agitarse a varias temperaturas antes de alcanzar la temperatura final de enfriamiento para evitar daños en la consistencia y viscosidad (Hill, Ross, Arendt, & Stanton, 2017).

3.11 Almacenamiento del yogurt

Una vez que el yogurt se ha enfriado a aproximadamente 20 °C, la actividad metabólica del cultivo casi cesa. Para su almacenamiento debe enfriarse a temperaturas <5 °C. Este enfriamiento da como resultado una mayor firmeza del gel debido al hinchamiento de las partículas de caseína a medida que sus interacciones hidrofóbicas se debilitan y se produce un aumento en el área de contacto entre las partículas. El contacto entre las partículas a través de enlaces de hidrógeno adicionales o enlaces cruzados de disulfuro entre la proteína de suero desnaturalizada y la caseína (Özer, B., Robinson, 2002) (Vasbinder, Alting, Visschers, & De Kruif, 2003) conduce a una textura mejorada, al igual que otros tipos de enlaces (Lauber, Klostermeyer, & Henle, 2001).

3.12 Fibra dietética en el yogurt

La incorporación de fibra dietética en matrices de alimentos puede generar un beneficio adicional en términos de valor nutricional y funcionalidad tecnológica (Kaczmarczyk, Miller y Freund, 2012; Thebaudin, Lefebvre, Harrington y Bourgeois, 1997). La fibra dietética puede aislarse de cereales o subproductos de frutas/verduras y sus propiedades funcionales, como agua ligada, el espesamiento o la formación de gel, dependen principalmente de la estructura física y la composición química (Elleuch et al., 2011; Larrauri, 1999; Tejada-Ortigoza, García-Amezquita, Serna-Saldívar y Welti-Chanes, 2016). Como consecuencia, la adición de fibra puede dar lugar a alteraciones en la textura o propiedades reológicas de los

alimentos enriquecidos con fibra. Además, las características de la fibra afectan la percepción sensorial dependiendo de la matriz alimentaria. En alimentos sólidos como el pan o los productos cárnicos, la adición de fibra está bien establecida. Estudios recientes señalan que su integración en los alimentos es factible sin cambios notables en la textura y las propiedades sensoriales (Angioloni & Collar, 2011; Guedes-Oliveira, Salgado, Costa-Lima, Guedes-Oliveira y Conte-Junior, 2016; Martins, Pinho, Ferreira, Jekle y Becker, 2017; Tomaschunas et al., 2013).

Por el contrario, la adición de fibra a los alimentos semisólidos como el yogurt sigue siendo una tarea difícil. Demirci et al. (2017) descubrieron que el salvado de arroz afectaba negativamente las características sensoriales del yogurt enriquecido en fibra en un intervalo de concentración del 1 al 3%. En un estudio realizado por Tomic et al. (2017) empleando concentraciones de fibra similares al estudio anterior, 1.5-3.0%, provenientes de avena o trigo encontraron que provocan una textura arenosa en un yogurt bajo en grasa. Por otro lado, la fibra dietética que consiste principalmente en fibra soluble tal como la inulina, puede mejorar la cremosidad y la aceptabilidad general del yogurt (Crispín-Isidro, Lobato-Calleros, Espinosa-Andrews, Alvarez-Ramirez, y Vernon-Carter, 2015; Guggisberg, Cuthbert-Steven, Piccinali, Bütikofer y Eberhard, 2009). Esto podría estar relacionado con una estabilización adicional del gel de yogurt por la matriz de inulina y con un aumento de la viscosidad y revela una estrecha vinculación entre la formación de la estructura y la percepción sensorial del yogurt enriquecido con fibra.

La fibra de frutas o vegetales contiene tanto una fracción insoluble (principalmente celulosa y hemicelulosa) como una fracción de fibra soluble (principalmente pectina) (Marín, Soler-Rivas, Benavente-García, Castillo y Pérez-Alvarez, 2007; Padayachee, Day, Howell y Gidley, 2017). Su proporción puede variar dependiendo de las condiciones de procesamiento

durante el aislamiento de la fibra de la materia prima respectiva (Chantaro, Devahastin, & Chiewchan, 2008; Kosmala et al., 2010; Tanongkankit, Chiewchan, & Devahastin, 2012). En principio, la adición de fibra al yogurt es un enfoque prometedor ya que la fibra insoluble y soluble pueden contribuir a la estabilización del yogurt por diferentes efectos relacionados con sus propiedades de unión al agua y mejora de la viscosidad. Estos efectos incluyen una mayor firmeza o una disminución de la sinéresis del gel de yogurt establecido (McCann, Fabre, & Day, 2011; Puvanenthiran, Stevovitch-Rykner, McCann, & Day, 2014). Sin embargo, los datos de la literatura revelan resultados heterogéneos a este respecto, que parecen estar fuertemente influenciados por la fuente de fibra, su composición y parámetros físicos (particularmente el tamaño de partícula). Se ha demostrado que la fibra de maracuyá reduce notablemente la sinéresis en el yogurt probiótico acompañado de un aumento de la visibilidad (Espírito-Santo et al., 2013). Al incorporar el polvo de cáscara de piña en un yogurt, aumentó significativamente la sinéresis mientras que la firmeza disminuyó durante los 28 días que se mantuvo refrigerado (Sah, Vasiljevic, McKechnie y Donkor, 2016). Esto último se atribuyó a una incompatibilidad entre las proteínas de la leche y los polisacáridos de la fibra. García-Pérez et al. (2006) aplicaron fibra de naranja en yogurt en varias concentraciones y descubrieron que con una dosis de fibra del 1%, la textura del yogurt mejoró y la sinéresis disminuyó, mientras que a concentraciones más bajas (<1%) se observaron efectos opuestos. Estos efectos se atribuyeron a una interrupción de la red de gel a una concentración de fibra baja, que podría compensarse con una capacidad de retención de agua mayor a una concentración de fibra alta. Resultados similares fueron reportados por Sendra et al. (2010) que correlacionaron positivamente los parámetros reológicos con la concentración de fibra de naranja en un intervalo de 0.2 a 1%. Además, Sendra et al. (2010) reportaron que el efecto disruptivo era más pronunciado con un tamaño de fibra pequeño a

medida que los módulos reológicos (G' , G'') se reducían al aumentar el tamaño de las partículas. En ambos estudios, el tamaño de la fibra varió entre 400 y 1000 μm . Esto resultó ser crítico con respecto a la percepción sensorial ya que la cremosidad se redujo significativamente en los yogures enriquecidos con fibra (García-Pérez et al., 2006).

Si bien los estudios mencionados revelan que la fibra insoluble puede interferir con la red de caseína hasta cierto punto, se sabe poco sobre el impacto de la fracción soluble, por ejemplo, pectina, en la fibra a base de fruta en la formación de la estructura. La pectina aislada juega un papel clave con respecto a la estabilización de la caseína y la formación de estructuras en productos lácteos acidificados. Por lo tanto, se pueden aplicar pectinas de alto grado de esterificación para proteger las micelas de caseína de la agregación a pH ácido (Endre y Christensen, 2009). A su vez, la pectina de bajo grado de esterificación puede fortalecer la red de caseína mediante un efecto puente entre los agregados de caseína a concentración baja (Everett y McLeod, 2005). Curiosamente, este efecto también ha sido descrito por Tuinier, Rolin y de Kruif 2002 para una pectina con un grado de esterificación del 61%, que se adsorbe en la superficie de la proteína a un pH <5.0 y una concentración baja que conduce a un puente entre los agregados de caseína. Sin embargo, a una concentración de $\sim 1\%$, se produjeron estabilizaciones de las micelas de caseína y se dificultó la agregación.

Hay poca información disponible sobre el efecto del contenido de pectina en el proceso de obtención de yogurt. La fibra de naranja rica en pectina se ha aplicado recientemente en geles de azúcar y ácido (Schalow, Baloufaud, Cottancin, Fischer y Drusch, 2018). Los autores plantearon la hipótesis de que la pectina se libera de las paredes celulares durante la preparación del gel a pH <3 y, por lo tanto, actúa como un agente gelificante. Kieserling, et al. (2019) mostraron que una combinación mecánica, homogeneización a presión alta, y

procesamiento térmico a pH~4 aumentaba la cantidad de sustancias insolubles en alcohol liberadas de la fibra de naranja rica en pectina. Además, la capacidad de retención de agua de la fracción de fibra insoluble aumentó notablemente. Por lo tanto, la fibra de naranja rica en pectina también podría ser un estabilizador prometedor en el yogurt.

3.13 Importancia de la pectina en el yogurt

Las pectinas son un grupo amplio de polisacáridos vegetales que contienen principalmente una estructura de unidades de ácido *D*-galacturónico unidos a través de enlaces glucosídicos α -*D*-(1,4), y pueden estar esterificados en diferentes grados o en forma de sal. Se pueden relacionar con otros polisacáridos como la hemicelulosa localizada en las paredes celulares de los vegetales, responsables de la firmeza de algunos productos.

Sin embargo, las pectinas constituyen a la familia de los heteropolisacáridos que se encuentran principalmente en las paredes celulares primarias de las plantas terrestres. Derivado de una palabra griega “*pektikos*” que significa congelado, el término pectina fue acuñado por Henri Braconot en 1825, quien realizó una comprensión inicial de la pectina, su funcionalidad y aplicaciones. La pectina es altamente valorada como un ingrediente alimentario funcional y se encuentra de forma generalizada en las frutas y verduras. Las pectinas contribuyen a la textura de los productos elaborados a partir de ellas. Las pectinas naturales tienen una masa molecular alta, mientras que las modificadas tienen una masa molecular relativamente baja. La pectina natural en frutas y verduras es un componente de los alimentos y actúa como fibra dietética soluble. Se utiliza principalmente como agente gelificante en mermeladas y jaleas; también se sabe que estabiliza eficazmente los jugos de frutas, bebidas de leche acidificadas y bebidas de frutas con un contenido de proteínas alto y en alimentos fortificados (Naqash, Masoodi, Rather, Wani, & Gani, 2017).

3.13.1 Pectina y calidad de los alimentos

Las pectinas debido a su masa molecular alta, carga total y distribución de carga se emplean como ingrediente para la formulación o modificación de alimentos. Los fabricantes de pectinas modifican de manera rutinaria las condiciones de producción, mezclando diferentes lotes para obtener la funcionalidad deseada y estandarizar los alimentos de acuerdo a los requerimientos del cliente. Las pectinas de alto grado de esterificación sensibles al calcio son un componente esencial en las bebidas ácido lácticas, que sirven para mantener la suspensión de proteínas a través de la interacción iónica con la superficie de la proteína cargada positivamente. Sin embargo, los bloques cargados dentro de la región de homogalacturonanos (HG) no son la única característica estructural de las pectinas que contribuyen a una estabilización de las bebidas ácido lácticas. Las pectinas no sensibles al calcio también tienen una aplicación potencial donde se prefieren geles más blandos debido a que retienen más agua que los geles de bajo grado de esterificación y a su vez se requiere de una cantidad menor de azúcar.

La modificación *in situ* de la pectina en los productos alimenticios procesados permiten diseñar alimentos, las operaciones unitarias que se utilizan por procesadores de alimentos, tal como los tratamientos térmicos, de presión alta y homogenización, alteran la estructura de las pectinas y sus cualidades organolépticas del producto procesado. La textura es una de las propiedades principales asociadas a la calidad afectada debido a cambios en la estructura de la pectina. Uno de los métodos más comunes para la conservación de alimentos y a la vez hacerlos más seguros microbiológicamente es el procesamiento a temperaturas altas; sin embargo, tiene un efecto secundario no deseado en la reacción de la β -eliminación que

conduce a la despolimerización y solubilización de la pectina. Esta es una causa principal de la degradación de la textura en muchos alimentos procesados.

Sin embargo, la pectina aislada juega un papel clave con respecto a la estabilización de caseína y la formación de estructuras en productos lácteos acidificados. Debido a esto se pueden usar pectinas de alto grado de esterificación para proteger las micelas de caseína, producto de la agregación a pH ácido. Sin embargo, la pectina de bajo grado de esterificación puede fortalecer la red de caseína mediante un efecto puente entre los agregados de caseína a baja concentración (Kieserling, Vu, Drusch, & Schalow, 2019).

3.13.2 Importancia de las pectinas en productos lácteos

La pectina puede tener dos funciones distintas en los productos lácteos y los análogos de los lácteos, como los preparados a partir de la soya. Las pectinas de alto grado de esterificación pueden actuar como estabilizadores de dispersión de proteínas a pH reducido. Por ejemplo, en yogurt, jugo de leche/fruta, bebidas de suero acidificadas y bebidas de soya acidificadas. Las pectinas de bajo grado de esterificación se comportan de manera bastante diferente y pueden usarse para gelificar postres lácteos neutros o como texturizadores en productos más ácidos, por ejemplo, yogurt agitado mediante interacción con calcio y proteínas de la leche. En las bebidas lácteas ácidas, la pectina es un coloide protector eficaz para la caseína o proteínas similares a un pH de alrededor de 4.0, típico del yogurt. En las bebidas de yogurt, la pectina se agrega después de la fermentación. Las bebidas de yogurt pueden formularse con bacterias vivas y de vida útil corta; sin embargo, también pueden pasteurizarse para una larga vida útil. Las bebidas de leche/jugo de fruta se acidifican por medio de jugo o ácido, como ácido cítrico o ácido láctico. Las bebidas de soya y las bebidas a base de otras fuentes de proteínas a menudo se acidifican de manera similar. Las bebidas que contienen proteínas

se tratan térmicamente a un pH ácido. Las proteínas tienden a agregarse y formar grupos más grandes que imparten una sensación arenosa en la boca y pueden precipitarse. Las moléculas de pectina de alto grado de esterificación están cargadas negativamente al pH real y se unen a las partículas de proteína y las protegen de la agregación incluso durante el tratamiento térmico. Sin embargo, la pectina también crea una red molecular débil en toda la bebida que contribuye a la estabilidad de la bebida. La dosis de pectina requerida depende del nivel de proteína en la bebida y del tamaño de las partículas de proteína. Un tamaño de partícula más pequeño generalmente proporciona bebidas más estables, pero un tamaño de partícula muy pequeño puede requerir una mayor dosis de pectina debido al área de superficie total más grande. El tamaño de partícula de proteína generalmente se controla optimizando las condiciones de fermentación o acidificación (Boiarkina, Young, Information, Centre, & Engineering, 2019).

3.13.3 Pectinas como estabilizadores

Los estabilizadores son hidrocoloides de origen vegetal y animal. El propósito principal de agregar estabilizadores al yogurt es mejorar la consistencia y aumentar la viscosidad, minimizar la separación del suero y retener el agua libre, y mantener la estructura del gel después de bombear, mezclar y enfriar, sin embargo, los estabilizadores aumentan la vida útil del producto y proporcionan un grado moderado de uniformidad de un lote a otro. Los estabilizadores funcionan a través de su capacidad para formar estructuras de gel en agua, dejando así menor cantidad de agua libre para la sinéresis. Algunos estabilizadores se acomplejan con caseína proporcionando un cuerpo adicional y una mayor protección contra la sinéresis. Preferentemente, la incorporación del estabilizador debe tener lugar usando un mezclador de alto cizallamiento que tenga una fuerte agitación que resulte en una dispersión

completa y una suspensión uniforme. Hay muchos estabilizadores y sus combinaciones disponibles en la industria para su uso en yogurt. El nivel de gelatina debe ajustarse a los estándares de consistencia para el yogurt. Las cantidades superiores al 0.35% tienden a dar yogurt con sólidos lácteos de tamaños relativamente altos y con grumos al agitar. La gelatina tiende a degradarse durante el procesamiento a temperaturas ultra altas, y su actividad depende de la temperatura. El gel de yogurt desarrollado por la gelatina se debilita considerablemente por un aumento de la temperatura. Habitualmente, se usan combinaciones de almidón-gelatina modificada o gelatina-pectina. Las relaciones de combinación de estabilizadores, así como la concentración final (generalmente de 0.50 a 2.00%) en el producto, se controlan cuidadosamente para obtener los efectos deseables. Las pectinas se usan comúnmente solas o en combinación con otros hidrocoloides para estabilizar el yogurt agitado y preparado. La pectina de bajo grado de esterificación es el tipo preferido para el yogurt refrigerado. Cantidades muy pequeñas (0.07–0.15%) modifican la consistencia del yogurt haciéndolo más rígido y evitando cualquier sinéresis que pueda surgir durante el manejo, transporte y distribución. Sin embargo, se prefiere la pectina de alto grado de esterificación debido al aseguramiento de la estabilidad y control de la viscosidad en las bebidas de leche acidificadas (Chandan & Services, 2017).

3.14 Gellan

El gellan es un polisacárido bacteriano, preparado a partir de la fermentación aeróbica sumergida de *Sphingomonas elodea*. Esta goma es un tetrasacárido lineal, constituido de unidades de 4-*L*-ramnopiranosil-(α -1 a 3)-*D*-glucopiranosil-(β -1 a 4)-*D*-glucuronopiranosil-(β -1 a 4)-*D*-glucopiranosil-(β -1 a 4) que contienen sustituyentes acetilo en la glucosa unida a 3. La solidificación se produce al enfriar las soluciones de gellan tratadas térmicamente en

condiciones de reposo mediante la asociación de sus dobles hélices. El gellan ha demostrado tener una excelente estabilidad en un intervalo amplio de pH y temperatura. Esto permite su uso en una gama amplia de productos alimenticios. Hasta ahora no se sabe de ningún estudio en donde hayan examinado el potencial de la goma gellan para actuar como un espesante en condiciones fisiológicamente relevantes (Torres et al., 2019).

Existen dos tipos de gellan, el primero de ellos se llama gellan de alto grado de esterificación (HA), se esterifica con 1-glicerato y acetato en las posiciones C-2 y C-6 de la *D*-glucosa ligada (1,3) respectivamente. El segundo tipo se llama gellan de bajo grado de esterificación (LA), el cual se produce por el tratamiento alcalino del caldo. Debido a los numerosos grupos hidroxilo, el gellan contribuye a las fuerzas electrostáticas y al impedimento estérico, lo que se puede ver en su estabilidad alta en varios sistemas coloidales. Sin embargo, se ha encontrado que la adición de gellan podría evitar la separación de fases en emulsiones (Buldo et al., 2016)

3.14.1 Importancia del gellan en la industria

El gellan es un polisacárido multifuncional, su temperatura de gelificación está influenciada principalmente por la presencia de diferentes cationes y por la concentración del polímero en el medio. El gellan además de ser un agente gelificante, también es usado como texturizador, estabilizador de películas y liberador de sabor. En la industria alimentaria el gellan es usado para geles a base de agua, así como en confitería, productos lácteos, rellenos de panadería, productos bajos en grasa para untar derivados de salsas y bebidas. Para evitar una textura granulada, generalmente se recomienda no exceder un contenido de 0.06 % de gellan de bajo grado de esterificación (LA) en el producto final y un 0.1 % de gellan de alto grado de esterificación (HA). Las propiedades de textura del gel formado por gellan de HA y LA son

muy diferentes, con gellan de HA se forma un gel suave y elástico a diferencia del gellan de LA que forma un gel frágil y estable al calor. En productos lácteos fermentados se requiere una cantidad baja ($< 1\%$) de gellan para lograr las propiedades del gel (Buldo et al., 2016).

3.15 Importancia de los análisis proximales

Los consumidores tienen muchas opciones con respecto al suministro de alimentos, por lo que son muy selectivos sobre los productos que adquieren debido a que exigen una amplia variedad de productos que sean seguros, que ofrezcan un buen valor nutricional y de alta calidad. Sin embargo, también han crecido los reclamos por parte de los consumidores respecto al análisis de alimentos desde la materia prima, ingredientes y producto terminado. Esto se debe a que los consumidores están interesados en la relación entre dieta y salud, incluyendo los alimentos funcionales que pueden proporcionar beneficios para la salud más allá de la nutrición básica. Los consumidores han cambiado las expectativas y hay un creciente interés por el suministro de alimentos. Esto implica realizar análisis proximales de alimentos (Nielsen, 2017).

3.15.1 Contenido de humedad en el yogurt

El contenido de humedad en los alimentos es importante debido a que es un factor en la calidad de los alimentos, la conservación y la resistencia al deterioro; sin embargo, la determinación del contenido de humedad también es necesaria para la determinación de otros componentes alimenticios de manera uniforme. La materia seca es el remanente del análisis de humedad y se conoce comúnmente como sólidos totales. Sin embargo, el contenido de humedad puede determinarse mediante una variedad de métodos, pero la obtención de datos precisos y exactos suele ser un desafío, los métodos para la determinación de humedad en

alimentos son relativamente sencillos ya que va desde una balanza analítica con una sensibilidad de 0.1 mg, horno de tiro forzado y placa caliente. Sin embargo, para la determinación de humedad en productos lácteos se utiliza el método de la AOAC 990.19, 990.20. Este método consiste en el pesado y etiquetado de muestras en crisoles, los cuales se llevan a 105 °C durante un intervalo de tiempo de 24 h para eliminar trazas de humedad. Posteriormente, se colocan 5 g de muestra en el crisol seco y atemperado, y se lleva a una evaporación de agua en un plato caliente sin que la muestra se seque completamente durante la manipulación de los crisoles. Para realizar esta operación es recomendable la utilización de guantes y agitar la muestra para cubrir los lados de los crisoles. Es importante evitar el desarrollo de una película en la superficie hasta que se evapore la mayor parte de agua. Una vez terminando este paso se lleva a cabo el secado de las muestras dentro de un horno de tiro forzado a 100 °C durante 3 h. Transcurrido este periodo de tiempo se retiran del horno de tiro forzado y se colocan dentro de un desecador para el enfriamiento y sucesivamente se pesan las muestras, el porcentaje de humedad es calculado (pesos/peso)(Nielsen, 2009).

3.15.2 Contenido de proteína en yogurt

La demanda de los consumidores de yogurt con alto contenido de proteínas ha venido aumentando en los últimos años. Esto se debe a los beneficios de las proteínas a la nutrición atribuidos a la capacidad de las proteínas de suero para aumentar los aminoácidos plasmáticos y desencadenar las síntesis de proteínas musculares. Adicionalmente, los yogures ricos en proteínas ofrecen beneficios en las dietas restringidas en calorías, debido a que la ingesta de energía de las proteínas tiene un mayor efecto sobre la saciedad que la ingesta de grasa o carbohidratos (Elise et al., 2019).

La cuantificación exacta de proteínas es esencial para todos los experimentos relacionados con proteínas en una multitud de temas de investigación. Los métodos de cuantificación de proteínas totales incluyen métodos tradicionales como la medición de la absorbancia a 280 nm; los ensayos de Bradford y el ácido bicinconínico, así como métodos alternativos como el de Lowry. Sin embargo, también existen los ensayos desarrollados por proveedores comerciales los cuales constan de kits bien diseñados y prácticos para cada tipo de ensayo. Los métodos de cuantificación de proteínas individuales incluyen el ELISA, el Western blot y la espectrometría de masas. A continuación, se explican la forma de medición, ventajas y desventajas de los ensayos más utilizados para la cuantificación de proteína en yogurt.

3.15.3 Métodos de cuantificación de proteína

3.15.3.1 Absorbancia ultravioleta (UV) a 280 nm

Los aminoácidos aromáticos tirosina y triptófano confieren a las proteínas su característico espectro de absorción ultravioleta (UV) a 280 nm. La fenilalanina y los puentes disulfuro también contribuyen a la absorción a la longitud de onda antes mencionada. Este es uno de los métodos más simples y requiere de volumen de muestra pequeña, debido a que los nuevos espectrómetros emplean un sistema de retención de muestra durante la medición. Sin embargo, la muestra proteica debe ser pura y no contener componentes no proteicos con el mismo espectro de absorción, tales como ácidos nucleicos contaminantes.

3.15.3.2 Ácido bicinconínico (BCA) o ensayo basado en cobre

Fue inventado por Paul K. Smith en 1985 en la compañía *Pierce Chemical Company*. El ensayo de BCA como el de Lowry se basa en la conversión del Cu^{2+} a Cu^{1+} en condiciones

alcalinas. Esta conversión es definida como la reacción de Biuret y está influenciada por cuatro aminoácidos (cisteína, cistina, tirosina y triptófano) y también por la cadena peptídica. BCA es un reactivo cromogénico específico para Cu^{1+} y en el segundo paso de la reacción dos moléculas de BCA reaccionan con un ion Cu^{1+} . La cantidad de Cu^{2+} reducido está en función de la concentración de proteínas y se puede determinar espectrofotométricamente por un cambio de color de la solución púrpura, que absorbe a 562 nm. La absorbancia es directamente proporcional a la cantidad de proteína presente en la solución y puede ser estimada por comparación con un estándar de proteína conocido como albúmina sérica bovina (BSA). El ensayo de BCA es uno de los más sensibles debido a que puede detectar proteínas a concentraciones tan bajas como 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y tiene menos variabilidad respecto a otros.

3.15.3.3 Ensayo de Bradford o azul brillante de Coomassie

Este método fue descrito originalmente por Marion Bradford en 1976, es uno de los métodos más populares para la determinación de la concentración de proteínas. Se basa en la formación de un complejo colorante azul brillante de Coomassie G-250 y las proteínas en solución. El colorante libre existe en cuatro formas iónicas, la forma azul más aniónica se une a proteínas y absorbe a 590 nm. La concentración de proteínas puede ser evaluada determinando la cantidad de colorante en su forma iónica azul y midiendo la absorbancia de la solución a 592 nm, utilizando un espectrofotómetro. El colorante se une principalmente a residuos de arginina, triptófano, tirosina, histidina y fenilalanina. Unas de las ventajas de este método se encuentran en su compatibilidad con agentes reductores utilizados para estabilizar las proteínas en solución, los cuales no son compatibles con los ensayos de Lowry y BCA.

Una de las desventajas de este ensayo es su incompatibilidad con detergentes, los cuales se utilizan de rutina para solubilizar proteínas de membrana.

3.15.3.4 Ensayo de Lowry para cuantificar proteínas

Este método fue propuesto por Oliver H. Lowry en 1951, se basa en dos reacciones químicas, la primera es la reducción de iones de cobre en condiciones alcalinas lo que forma un complejo con los enlaces peptídicos (reacción de Biuret) y la segunda es la reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu por el complejo cobre-enlace peptídico la cual hace un cambio de color a azulado en la solución con una absorción en el intervalo de 650 a 750 nm. La cantidad de proteína en la muestra puede ser estimada utilizando una curva de calibración con una solución de una proteína estándar seleccionada, tal como la albúmina de suero bovino. Las ventajas de este ensayo son su sensibilidad y lo más importante es su exactitud, sin embargo, requiere de más tiempo que otros ensayos y muchos compuestos comúnmente utilizados en búferes de preparación de proteínas.¹

3.15.4 Contenido de grasa en yogurt

Aunque gran parte del yogurt vendido en los países industrializados se produce a partir de leche desnatada, el yogurt tradicional está constituido por 3-4 % de grasa y el yogurt estilo griego contiene 9-10 % de grasa (Buttriss, 1997). Los lípidos son una parte integral de una dieta equilibrada. Por lo tanto, los humanos tienen un doble requerimiento de lípidos. El primer requerimiento está relacionado con el almacenamiento de grasa compuesta de ácidos grasos saturados y que sirve como fuente de energía o como protección para órganos vitales.

¹ Labome. The world of laboratories. Mater Methods 2012;2:115. <https://www.labome.com/method/Protein-Quantitation.html>. Consultada el 07 de agosto de 2019.

Mientras que el segundo requerimiento de lípidos está relacionado con la grasa estructural que, junto con proteínas, forma muchas de las membranas esenciales en las células animales, particularmente en áreas como el cerebro. Por lo tanto, es indispensable que la dieta humana proporcione una fuente adecuada de grasas. Cada gramo de grasa proporciona alrededor de 9 kcal de energía. Además de esta ventaja básica de consumir yogurt con grasa, también debe enfatizarse que la grasa de la leche contiene una diversidad amplia de ácidos grasos. La mayoría de estas grasas se encuentran en la leche en forma de glicéridos, se han identificado más de 400 ácidos grasos individuales en la leche de vaca (Patton & Jensen, 1975).

3.15.4.1 Cuantificación de grasa total

La grasa cruda también es conocida como la mezcla cruda de material liposoluble presente en alimentos, se ha venido determinando tradicionalmente mediante métodos que implican la extracción con disolventes orgánicos, el secado del extracto y una determinación gravimétrica de la grasa. Entre estos métodos de cuantificación se encuentran el de Folch, Soxhlet, Weibull-Berntrop y Rose-Gottlieb. Sin embargo, los métodos de Folch y Bligh-Dyer son considerados los más confiables para extraer lípidos cuantitativamente en tejidos de animales y productos de panadería, también el método de soxhlet es el método oficial recomendado, pero tiene una gran desventaja debido a que su tiempo de extracción es relativamente largo, se requiere de un tiempo de 16 a 24 h. También es necesario el empleo de temperaturas altas (Shin & Park, 2015).

El contenido de grasa de un producto lácteo fermentado es una determinación importante de calidad, tanto económica como fisiológica. Sin embargo, en la industria láctea es determinada mediante métodos rápidos, en los que están principalmente los métodos espectrométricos;

sin embargo, tienen una desventaja, los equipos se deben calibrar constantemente y esta acción es muy costosa. Por lo tanto, existen métodos alternativos para la determinación de grasas en productos alimenticios (Badertscher, Berger, & Kuhn, 2007).

3.15.4.2 Cuantificación de grasa por el método de Gerber

Este método fue inventado por el químico suizo y propietario de productos lácteos Niklaus Gerber, patentado en 1891 bajo el nombre de “ácido-butirometría”, hasta el día de hoy este método es muy usado debido a que es simple, rápido, de costo bajo y adecuado para un rendimiento de muestra relativamente alto. Como todo método, además de ventajas también tiene desventajas debido a que la determinación no puede automatizarse e implica un cierto riesgo en el manejo del ácido sulfúrico concentrado. Especialmente al leer el butirómetro, el manejo de este requiere de habilidades prácticas, lo que tiene un efecto negativo en la confiabilidad del método (Badertscher et al., 2007).

3.15.5 Lactosa en yogurt

En la mayoría de los casos, la principal fuente de lactosa en el yogurt es la leche o la leche en polvo. La leche generalmente contiene 4.0-5.0 % de lactosa. En muchos casos, los ingredientes lácteos se agregan a la leche para aumentar el contenido de proteínas antes de la fabricación del yogurt. En particular, la leche descremada en polvo (LDP), el concentrado de proteína de suero (CPS) y el concentrado de proteína de leche (CPL) son ingredientes populares. La LDP contiene entre 30 y 35% de proteína y 50-55% de lactosa en base seca. La fortificación de proteínas también implica un aumento considerable en el contenido de lactosa. Para CPS y CPL, la cantidad de lactosa agregada depende del tipo de concentrado. Los ingredientes bajos en proteínas, como CPS35, darán lugar a incrementos considerables

en el contenido de lactosa, mientras que el uso de ingredientes altos en proteínas, como CPS80 o CPL80, permite la fortificación de proteínas sin grandes incrementos en el contenido de lactosa. Los caseinatos, que también se usan para la formación de proteínas, contienen solo niveles muy bajos de lactosa y, por lo tanto, no contribuyen en gran medida a la lactosa presente en el yogurt.

3.15.5.1 Fermentación de lactosa en el yogurt

Una de las funciones clave de la lactosa es su conversión en ácido láctico por las bacterias ácido lácticas durante la producción de yogurt. La mezcla de *Streptococcus thermophilus* homofermentativo termofílico y *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, metabolizan la lactosa y la glucosa hidrolizada a partir de la lactosa, pero no metabolizan la galactosa. Aunque los dos microorganismos pueden crecer individualmente en la leche, tienen una interacción simbiótica llamada "protooperación" en cultivos mixtos, lo que significa que son mutuamente beneficiosos durante la fermentación (Sieuwert, De Bok, Hugenholtz, & Van Hylckama Vlieg, 2008); (A. Y. Tamime, 2002). La lactosa es la principal fuente de carbono y energía para las bacterias ácido lácticas en la producción de yogurt. Las bacterias ácido lácticas convierten la lactosa en ácido láctico, lo que le da al yogurt el sabor ácido característico. En el proceso de producción de yogurt, alrededor del 20 al 40 % de la lactosa presente en la leche se transforma en ácido láctico, y el contenido de ácido láctico en el yogurt es de alrededor del 0.9 % (Shiby & Mishra, 2013), (A. Y. Tamime, 1999). La fermentación de lactosa por bacterias ácido lácticas puede ser homofermentativa o heterofermentativa, dependiendo de la especie, el sustrato y las condiciones ambientales (Mayo, B., Aleksandrak - Piekarczyk, T., Fernández, M., Kowalczyk, M., Álvarez - Martín, P., &

Bardowski, 2010). Las vías homofermentativas generan ácido láctico como producto final principal, mientras que en el metabolismo heterofermentativo, el ácido láctico continúa metabolizándose, lo que conduce a etanol, dióxido de carbono o ácido acético (Holzapfel, WH, y Wood, 2014). En la fabricación de yogurt, típicamente se presenta la fermentación homofermentativa. Durante la fermentación, la glucosa proveniente de la hidrólisis de la lactosa se transforma a ácido láctico, mientras que la galactosa, el segundo producto de la hidrólisis de la lactosa, no se metaboliza.

3.15.5.2 Efecto de la lactosa en el yogurt

El principal efecto de la lactosa en el yogurt es a través de la formación de ácido láctico y la consecuente acidificación. Como resultado de la reducción del pH, la estabilidad coloidal de las proteínas de la leche se reduce y, una vez que se supera la repulsión estérica y electrostática, puede ocurrir la agregación de proteínas. En la fabricación de yogurt, la leche generalmente se precalienta intensamente y la agregación inicial involucra agregados de proteínas de suero desnaturizadas (que también pueden incluir algo de κ -caseína) y micelas de caseína que contienen proteínas de suero desnaturizadas en la superficie. Además, los glóbulos de grasa cubiertos de proteínas también participan en estos procesos de agregación. Dicha agregación generalmente inicia a un pH de 5.2–5.6, dependiendo de la composición y las condiciones de precalentamiento e intensidad. Después de la agregación inicial, el crecimiento de los agregados continuará hasta que finalmente se forme una red autosuficiente, que proporcione la textura, estructura y estabilidad deseadas del yogurt.

Adicionalmente, la hidrólisis de lactosa también puede tener efectos notables en la estructura del yogurt. Esto se hizo evidente en un estudio realizado con una mezcla de yogurt

preincubado con lactasa, donde se descubrió que la producción de ácido aumentaba y, como resultado, la coagulación inducida por el ácido se producía más rápidamente, la fuerza del gel disminuía y la expulsión del suero aumentaba (Nagaraj, Sharanagouda, Manjunath, & Manafi, 2009); (Schmidt, Mende, Jaros, & Rohm, 2016) también observaron una viscosidad reducida cuando la lactosa se hidrolizó antes o simultáneamente con la fermentación, pero encontraron que tales efectos dependen tanto del tipo de yogurt (estilo regular o griego) como del cultivo utilizado. Los efectos del cultivo están relacionados con el efecto de la hidrólisis de la lactosa en la velocidad de acidificación. Es decir, en los casos en que se descubrió que la hidrólisis de la lactosa aumentaba la velocidad de acidificación, se observaron reducciones en la viscosidad, mientras que en los casos en que la velocidad de acidificación no se vio afectada, la hidrólisis de la lactosa no se vio afectada fuertemente (Schmidt et al., 2016). Los efectos pueden explicarse con base en los resultados reportados por (Vasbinder et al., 2003). En ese estudio se encontró que el tiempo de incubación, después de iniciada la coagulación es crucial para lograr la firmeza del gel. Esto posiblemente se debe a la formación de enlaces disulfuro entre las proteínas, promoviendo su entrelazamiento tridimensional, proceso conocido como reticulación. Por lo tanto, una acidificación más rápida como resultado de la hidrólisis de lactosa (Nagaraj et al., 2009); (Schmidt et al., 2016) puede reducir el tiempo disponible para que se forme dicha reticulación. Adicionalmente, (Schmidt et al., 2016) también descubrieron que la hidrólisis de lactosa tendía a aumentar la producción de exopolisacáridos.

3.15.6 Acidez titulable en yogurt

Existen variaciones de métodos oficiales que están en función de la concentración de la solución alcalina, el volumen de muestra y la concentración de fenolftaleína. Adicional a las

variaciones metodológicas, existen diferentes unidades para expresar los resultados obtenidos por ejemplo grados Dornic ($^{\circ}\text{D}$), grados Soxhlet-Henkel (SH) y grados Thorner. La medición de acidez titulable está basada en la titulación de una muestra conteniendo un indicador con un volumen de disolución alcalina (hidróxido de sodio) de una concentración exacta. Esta última disolución se adiciona a la muestra hasta que alcance el punto de neutralización, determinado por la presencia de un indicador (fenolftaleína) que se torna a un color rosa a un pH de 8.4 (Fabro et al., 2006).

3.15.7 Contenido de cenizas en el yogurt

Las cenizas son el residuo inorgánico que se obtiene después de que el agua y la materia orgánica han sido eliminadas mediante una calcinación en presencia de aire. Esto proporciona una medida de la cantidad total de minerales dentro de un alimento. Los minerales no se eliminan por calentamiento, debido a que la mayoría de ellos presenta una menor volatilidad respecto a otros compuestos alimentarios. Las cenizas están compuestas principalmente por potasio, sodio, calcio, magnesio y zinc. Las cenizas en un alimento son un parámetro clave debido a que proporcionan información proximal para una correcta evaluación nutricional. El contenido de cenizas es altamente aceptado como un índice de refinamiento de los alimentos (Perring & Tschopp, 2019).

Las cenizas en biomásas se miden comúnmente de forma gravimétrica quemando la muestra en una mufla a temperaturas altas durante un intervalo de tiempo específico. Al proceso de determinación de cenizas se le conoce como oxidación seca. Sin embargo, existe una gran variación en la temperatura y la duración de la ceniza, así como en el tamaño de la muestra para la determinación del contenido de cenizas en diversos materiales biológicos. El método oficial 923.03 de la AOAC está basado en calcinar de 3 a 5 g de muestra a 550°C en un

intervalo de tiempo de 12 a 18 h. Para alimentos de origen animal es utilizado el método AOAC 942.05 y está basado en calcinar 2 g de muestra a 600 °C durante 2 h (K. Liu, 2019). Sin embargo, (Nielsen, 2009) menciona el proceso para desarrollar la metodología de forma eficaz en la determinación de cenizas en un alimento. De acuerdo a este procedimiento, cuando se trata de un derivado lácteo por ejemplo el queso, el primer paso es la determinación del contenido de humedad debido a que ayuda a calcular el contenido de cenizas sobre una base de peso seco. Sucesivamente en un crisol se pesan 2 g de muestra, los crisoles con la muestra son llevados a un horno de mufla a 550 °C durante 24 h. Transcurrido este tiempo, la mufla se apaga y se deja enfriar para poder retirar los crisoles con la muestra incinerada y se colocan dentro de un desecador para que se enfríen durante 24 h. Después, el crisol con la muestra se pesa, y al valor de la masa medida se le resta el peso del crisol. Este resultado es el contenido de cenizas.

3.15.8 El pH en el yogurt

El pH es definido como el logaritmo negativo de las concentraciones de iones de hidrógeno y puede abarcar un intervalo de 14 órdenes de magnitudes. El pH en los alimentos no sólo es una función del tipo y las concentraciones de ácido ionizado. Cuando las bases conjugadas de los ácidos están presentes en cantidades similares, el sistema se puede describir como un tampón. La escala ordinaria de pH se encuentra en el intervalo de 1 a 14.

La medición o determinación del pH es relativamente fácil y rápido debido a que se usan electrodos de pH en el cual se debe considerar el concepto de actividad respecto a concentración. Esta concentración es una medida de los iones hidrógeno en disolución. Debido a las interacciones ion-ion y ion-disolvente, la concentración o actividad es efectiva,

y el valor medido es menor que la concentración real. Generalmente, la actividad y la concentración tienden a aproximarse entre sí a una dilución infinita (Nielsen, 2017).

4. ORIGINALIDAD

El presente trabajo consistió en desarrollar un proceso de producción de yogurt aplanado con un contenido bajo de lactosa estabilizado con pectina aislada a partir de los frutos verdes de tempesquistle y gellan. El proceso de fermentación se llevó a cabo a una temperatura constante de 42 °C hasta alcanzar un pH de alrededor 4.5. La composición química (proteínas totales, azúcares, grasas, humedad y cenizas) de los productos permitió determinar el efecto de las pectinas.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

La parte experimental del presente proyecto se desarrolló en el laboratorio de bromatología del Instituto de Agroindustrias y en el laboratorio de Principios Bioactivos de la Universidad Tecnológica de la Mixteca, ubicada en carretera a Acatlima K.m. 2.5, Huajuapán de León, Oax, Mex.

5.1 Materiales utilizados en la experimentación

Crisoles de porcelana (sin tipo), potenciómetro (OHAUS), Centrifuga Gerber (sin tipo), butirómetro (Gerber), tapones para butirómetro (sin tipo), pipetas graduadas de 1 y 10 mL, gradilla metálica (sin tipo), matraz Erlenmeyer (CIVEQ) parrilla eléctrica con agitación constante (Thermo SCIENTIFIC), barras de agitación (sin tipo), Soporte universal (genérica), pinzas para bureta (sin tipo), bureta (marca CIVEQ), matraz Erlenmeyer 100 mL (CIVEQ), horno de secado (marca Prendo modelo HSCF-30), desecador (sin tipo), Microplaca de 96 pocillos de 160 µL cada pocillo (costar), micropipeta de 100-1000 µL (Smart) y de 10 a 100 µL (Smart), vórtex, centrifuga (sin tipo), tubos eppendorf de 1 mL (sin tipo).

5.2 Reactivos

Ftalato ácido de potasio, H₂O tipo 1, fenolftaleína, H₂SO₄ concentrado al 91 %, alcohol isoamílico, CuSO₄.5H₂O, NaOH, KI, KNaC₄ H₄O₆.4H₂O.

5.3 Procedimiento general de elaboración de yogurt

La elaboración de yogurt se realizó a partir de leche en polvo baja en grasas y azúcares de la marca svelty que se mezcló con agua hasta alcanzar 15 % (*m/v*) de sólidos. Se prepararon 150 mL de conteniendo, 22.5 g de leche en polvo y 127.5 mL de agua. Posteriormente se llevó a una pasteurización con agitación constante mediante un agitador magnético a 85 °C durante 20 min (en el caso de tratamientos con el agente gelificante Gellan se agregó desde el inicio de la pasteurización), después se disminuyó la temperatura a 75 °C y se adicionó pectina. En la Tabla 2 se muestran las concentraciones de pectina de tempesquistle y pectina comercial para cada tratamiento de fermentación. Después de adicionar estos agentes gelificantes, la mezcla se mantuvo en agitación magnética con ayuda de una parrilla térmica y barras de agitación constante durante 5 min para su hidratación e incorporación en la leche. Después se realizó una agitación con una batidora manual durante 1 min para realizar la incorporación adecuada de la pectina. Posteriormente, la mezcla se llevó a baño de agua fría y cuando se alcanzó una temperatura de 43-45 °C se realizó la inoculación con los microorganismos fermentativos al 10 % del volumen total de leche pasteurizada es decir para 150 mL de leche, se utilizaron 15 mL de inóculo. Como iniciador se utilizaron microorganismos previamente activados de la marca Yogourmet. Después de haber realizado la inoculación se envasaron en frascos de vidrio transparentes de aproximadamente 50 mL cada uno para sucesivamente llevar a cabo la fermentación dentro de una yogurtera de la marca EURO Cuisine con baño de agua a temperatura de 43 a 45 °C hasta alcanzar un pH en un intervalo de 4.3 a 4.5. Una vez alcanzado el pH se detuvo la fermentación en un baño de agua a una temperatura de 2 °C durante 10 min y sucesivamente se llevó a refrigeración a 4 °C en un refrigerador.

Tabla 2. Concentraciones de agentes gelificante utilizados en cada uno de los tratamientos.

	Gellan (%)	pectina comercial (%)	pectina de Tempesquistle (%)
YG	0.06	N/A	N/A
YPC	N/A	1	N/A
YPCG	0.06	1	N/A
YPT	N/A	N/A	1
YPTG	0.06	N/A	1

YG = Yogurt con gellan al 0.06 %, YPC = Yogurt con pectina comercial al 1 %, YPCG= Yogurt con pectina comercial al 1 % y gellan al 0.06 %, YPT = Yogurt con pectina de tempesquistle al 1 %, YPTG = Yogurt con pectina de tempesquistle al 1 % y gellan al 0.06 %, N/A = no aplica.

5.4 Determinación de pH

La determinación de pH se realizó con la ayuda de un potenciómetro con electrodo de lápiz (genérico). Este potenciómetro permitió medir el pH inicial de la leche y monitorear el pH durante el proceso de fermentación del yogurt. Los valores del pH de la mezcla de fermentación se registraron cada hora hasta obtener un pH en un intervalo de 4.3 a 4.5. Después de alcanzar un pH en ese intervalo, la mezcla se sometió a un baño de agua fría de entre 0 a 4°C para detener el proceso de fermentación. Finalmente, el fermentado se transfirió a recipientes de plástico ámbar para su almacenamiento en un refrigerador a 4°C.

5.5 Determinación de Humedad

La determinación de humedad se realizó por el método de la AOAC 934.06 en el cual se agregaron 5 g de yogurt en un crisol de porcelana, previamente llevado a peso constante, una vez teniendo los crisoles y muestras requeridas se colocaron dentro de una estufa a 105 °C, haciendo el primer pesaje a las 6 h. Los crisoles se sacaron de la estufa y se colocaron dentro de un desecador para enfriar durante un intervalo de 15 a 20 min. Posteriormente, los crisoles

se pesaron y se registró el peso obtenido de cada una de las muestras. Los crisoles con las muestras se vuelven a colocar dentro de la estufa y se continúa monitoreando el peso de los crisoles con las muestras cada 6 h, hasta que se observó una variación de peso menor a 5 mg respecto al penúltimo peso registrado. A las 36 h de iniciar el secado se obtuvieron las muestras con una variación de masa en un intervalo de 3 a 5 mg.

La determinación de humedad se realizó con la formula siguiente:

$$\% \text{ humedad} = \left(\frac{p_2}{p_1} \right) * 100$$

Donde:

P₂= masa final en g de la muestra

P₁= masa inicial en g de la muestra

5.6 Cuantificación de cenizas

La determinación de cenizas se realizó por el método de la AOAC 923.03. Este método consiste en emplear la muestra seca obtenida en la etapa de determinación de humedad (sección 5.5). El peso final de cada una de las muestras en esta determinación se registró como el peso inicial para la determinación de porcentaje de cenizas. Estas muestras se carbonizan en una parrilla a 540 °C durante un intervalo de tiempo de 25 a 35 min. Posteriormente, estas muestras se calcinaron en una mufla durante un periodo de tiempo de 96 h. Al concluir el período de calcinación, las muestras de cenizas mostraron una coloración blanca que indicó la oxidación y vaporización completa de los residuos orgánicos. Las muestras se dejaron enfriar en un desecador durante 15 min, y finalmente se pesaron en la balanza analítica.

Para la determinación del % de cenizas se utilizó la fórmula siguiente:

$$\% \text{ Cenizas} = \left(\frac{c_3 - c_2}{c_1} \right) * 100$$

Donde:

C_3 = masa del crisol y las cenizas en g

C_2 = masa del crisol sin las cenizas en g

C_1 = masa de la muestra en g

5.7 Cuantificación de grasas

La determinación de grasas se llevó a cabo por el método de Gerber. Este método consistió en transferir una alícuota de 12.5 mL de yogurt a un matraz Erlenmeyer de 50 mL y después se adicionaron 25 mL de H₂O tipo 1. Esta mezcla se agitó constantemente durante 15 min a 20 °C en una parrilla eléctrica con agitación dentro de una campana de extracción de vapores. Posteriormente, se agregaron cuidadosamente 10 mL de H₂SO₄ concentrado a un butirómetro, seguido de la adición de 11 mL de la disolución de muestra en H₂O tipo 1 previamente preparada. Durante la adición se tuvo el cuidado de evitar una reacción violenta de la muestra con el H₂SO₄. Por último, a la mezcla contenida en el butirómetro se le agregó 1 mL de alcohol isoamílico y se le colocó el tapón para butirómetro. Con un trapo semihúmedo se realizó una agitación de dos tiempos, en el primer tiempo se efectuó una agitación vigorosa sin interrupciones y sin inversiones, hasta conseguir que el H₂SO₄ en conjunto con la disolución y el alcohol isoamílico hicieran reacción y durante el segundo tiempo se invirtió el butirómetro. La agitación se suspendió cuando se observó completamente disuelta la proteína y se llevó dentro de la centrifuga de Gerber para someter la muestra a una centrifugación durante 5 min. El butirómetro se llevó a un baño de agua a 65 °C durante 5 min, tiempo necesario para lograr una separación efectiva de toda la grasa, después se sacó el butirómetro del baño y se colocó verticalmente para finalmente realizar la toma de lectura. El contenido de grasa presente en la muestra, se expresó en porcentaje y se calculó de la manera siguiente:

% de grasa = $B-A$.

Donde:

A= lectura al inicio de la columna de grasa.

B= lectura de la parte superior de la columna de grasa.

5.8 Acidez titulable

5.8.1 Valoración de NaOH 0.1N

En un vaso de precipitados se colocó una muestra de 5 g de ftalato de potasio y se secó en una estufa a 110 °C durante una hora. Transcurrido este tiempo se enfrió en un desecador. A partir de esta muestra de ftalato de potasio seco, se pesaron 816 mg y se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 100 mL de la marca CIVEQ, se le adicionaron 50 mL de H₂O tipo 1 y 2 gotas de indicador fenolftaleína. La mezcla se agitó manualmente con la ayuda de un soporte universal, unas pinzas para buretas y una bureta graduada. La titulación de esta solución se efectuó con NaOH 0.1 N hasta que la disolución transparente se torno de color rosa permanente. Este procedimiento se realizó por triplicado. La titulación de cada muestra se realizó por triplicado y con estos datos se calculó el promedio y la desviación estándar. Una vez obtenida la valoración del NaOH, que fue 0.091 N, se prosiguió a la determinación de la acidez de las muestras de yogurt.

5.8.2 Determinación de acidez titulable en muestras de yogurt

En un matraz Erlenmeyer de 100 mL de la marca CIVEQ se adicionaron 3 mL de muestra (yogurt), 10 mL de H₂O y 3 gotas del indicador fenolftaleína. Posteriormente, la mezcla se homogenizó durante 1 min, seguido de la adición gota a gota de NaOH 0.091 N desde una bureta. La adición de NaOH 0.091 N se suspendió cuando el color de la muestra de yogurt cambió de un color blanco a un color rosa mexicano permanente durante 30 s. Finalmente se

realizó la cuantificación de acidez en equivalentes de ácido láctico (g de ácido láctico por cada 100 g de muestra). Para la determinación del porcentaje de acidez se utilizó la ecuación siguiente:

$$\text{Acidez} \left[\frac{\text{g de ácido láctico}}{100 \text{ g de muestra}} \right] = \frac{V * N * 0.09}{M} * 1000$$

Donde:

V = volumen en mL de hidróxido de sodio 0.091 N gastados en la titulación

N = normalidad de la solución de hidróxido de sodio = 0.091 N

M = Volumen en mL de la muestra usada para la titulación

0.09 = Miliequivalentes de ácido láctico

5.9 Cuantificación de proteína por el método de Biuret

5.9.1 Elaboración de la curva de calibración para la determinación de proteína

La curva de calibración se obtuvo en un espectrofotómetro de la marca BioTeK de modelo ELx808 localizado en el laboratorio de bromatología en el instituto de agroindustrias. 0.5 g de caseína se mezclaron con 20 mL de NaOH 6 M. La mezcla se dejó en agitación constante a temperatura ambiente durante 24 h. Una vez transcurrido este tiempo se logró observar que la caseína se había solubilizado completamente. A partir de esta disolución se prepararon cinco estándares a concentraciones de 5, 10, 15, 20 y 25 mg/mL para la construcción de la curva de calibración. Posteriormente, 30 µL de cada uno de los estándares se agregaron, por triplicado, en una microplaca de 96 pozos con capacidad de 160 µL c/u. Posteriormente, a cada pozo con disolución del estándar de caseína a las distintas concentraciones se le agregaron 120 µL de reactivo de Biuret. Los blancos de los estándares se prepararon con 30 µL de cada estándar y se le agregaron 120 µL de tartrato de sodio alcalino. Después, la

microplaca se introdujo dentro del espectrofotómetro y se dejó reposar durante 10 min, transcurrido este tiempo se hizo una agitación durante 1 min y por último se realizó la lectura de la absorbancia a 540 nm y como resultado se obtuvo una curva de calibración (Krohn, 2002). La preparación del reactivo de Biuret se describe en el Apéndice 7.

5.9.2 Preparación de las muestras de yogurt para la determinación de proteínas

La preparación de la muestra consistió en medir un volumen de 0.5 mL de yogurt homogenizado y transferirlo a un tubo eppendorf y se agregaron 0.5 mL de NaOH 6 M y se dejó en agitación constante durante 24 h en un Vórtex de la marca IKA. Una vez transcurrido este tiempo se llevó a una centrifugación en una centrífuga genérica durante 30 min. Una vez realizando esta operación se logró observar una separación de fases de grasa y proteína. Con ayuda de una pipeta Pasteur se extrajo la fracción de proteína del tubo eppendorf y se colocó en un tubo limpio. Posteriormente, con una micropipeta se midieron 30 μ L de la disolución de proteína de la muestra solubilizada y se llevaron a una microplaca para después agregarle 120 μ L del reactivo de Biuret. El blanco de la muestra consistió de 30 μ L de la disolución de proteína solubilizada y 120 μ L de tartrato de sodio alcalino. Posteriormente, la microplaca se colocó en el espectrofotómetro y se dejó reposar durante 10 min. Transcurrido este tiempo la microplaca se agitó durante 1 min y se midió la absorbancia a 540 nm. Este procedimiento fue aplicado para los 5 tratamientos diferentes con 3 réplicas por cada tratamiento.

5.10 Cuantificación de carbohidratos

La determinación de carbohidratos se realizó por el método colorimétrico de Somogyi-Nelson, adaptado a un lector de microplaca. El estándar empleado para construir la curva de calibración fue lactosa. Para obtener la curva de calibración, primero se preparó una

disolución patrón de 1000 $\mu\text{g/mL}$ de lactosa que se preparó con 20 mg de lactosa llevados a un volumen de 20 mL con H_2O tipo 1 en un matraz volumétrico. Para disolver completamente la lactosa, la mezcla se agitó constantemente a temperatura ambiente durante 15 min. Transcurrido este tiempo la lactosa se solubilizó completamente. Posteriormente, a partir de esta disolución se prepararon disoluciones de lactosa a concentraciones de 50, 100, 150 y 200 $\mu\text{g/mL}$. 50 μL de cada una de las disoluciones se agregaron por triplicado a una microplaca de 96 pozos, con capacidad de 160 μL c/u. Después se agregaron 50 μL del reactivo de Somogy a cada uno de los pozos con disolución. Los blancos de los estándares se prepararon con 50 μL de agua tipo 1 en lugar de la disolución de lactosa y se le agregaron 50 μL del reactivo de Somogy. Después, la microplaca se cubrió con una tapa de silicona y se envolvió con papel aluminio y se llevó a un baño de agua a 92°C durante 20 min. Transcurrido este tiempo, la microplaca se retiró del baño y se llevó dentro de una bolsa de cierre hermético ziploc y se trasladó a un baño de agua fría a 4°C durante 5 min pasando este tiempo se le retiró la cubierta de aluminio y la tapa de silicona y se le adicionaron a cada pocillo con solución 50 μL del reactivo de Nelson y se dejó reposar 30 min asegurándose que se eliminaran completamente las burbujas de la dilución. Después, la microplaca se colocó en el espectrofotómetro y se le realizó una agitación durante 10 s, y se midió la absorbancia a 600 nm en un lector de microplacas BioTek. Este procedimiento fue aplicado para las cinco muestras de yogurt por triplicado (J. Liu, Li, Song, & Wang, 2018). La preparación de los reactivos de Somogyi-Nelson se describe en los Apéndices 9 y 10.

5.11 Análisis estadístico

Para realizar el análisis comparativo entre tratamientos se realizó un ANOVA simple y un comparativo de medias de Tukey.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Elaboración y fermentación de yogurt afluado utilizando como agentes estabilizantes pectina de tempequistle, pectina comercial y gellan

La obtención de muestras de yogurt afluado de los cinco tratamientos se llevó a cabo a partir del método general de elaboración de yogurt reportado por (Hill et al., 2017). Los tratamientos empleados fueron cinco y todos implicaron el uso individual o combinado de pectina y/o gellan. La incorporación de los agentes gelificantes durante el proceso de fermentación promovió una mayor firmeza en los productos. El control, donde solo se adicionó Gellan, condujo a un yogurt con sinéresis (Figura 2). En la Tabla 2 se presentan el % de humedad, % de acidez y pH de los cinco productos. Los resultados muestran que el producto con menor contenido de humedad fue el preparado con gellan (YG), mientras que los preparados con la pectina comercial presentaron el mayor contenido de humedad (YPC y YPCG).



Figura 2. Obtención de yogurt a partir de una fermentación láctica con Gellan como agente gelificante.

Respecto al % de acidez, los resultados muestran que todos los tratamientos son estadísticamente iguales. Mientras que los valores de pH muestran que el tratamiento YPC,

el yogurt obtenido con pectina comercial, presentó el valor más alto respecto al resto de los pretratamientos.

Tabla 3. Resultados de análisis fisicoquímicos de los diferentes tratamientos de yogurt.

Muestra	% Humedad	% Acidez total	pH
YG	81.72 ± 0.17 ^a	0.45 ± 0.06 ^a	4.56 ± 0.03 ^a
YPC	86.40 ± 0.08 ^d	0.45 ± 0.06 ^a	5.30 ± 0.20 ^b
YPCG	86.47 ± 0.10 ^d	0.45 ± 0.06 ^a	4.55 ± 0.02 ^a
YPT	84.55 ± 0.23 ^c	0.46 ± 0.06 ^a	4.52 ± 0.01 ^a
YPTG	83.14 ± 0.22 ^b	0.45 ± 0.06 ^a	4.54 ± 0.03 ^a

YG = Yogurt con gellan al 0.06 %, YPC = Yogurt con pectina comercial al 1 %, YPCG= Yogurt con pectina comercial al 1 % y gellan al 0.06 %, YPT = Yogurt con pectina de tempesquistle al 1 %, YPTG = Yogurt con pectina de tempesquistle al 1 % y gellan al 0.06 %. En las columnas los valores con letras distintas indican una diferencia significativa empleando la prueba de Tukey a un nivel de significancia $\alpha = 0.05$.

Tabla 4. Resultados de análisis proximales de los diferentes tratamientos de yogurt.

Muestra	% de proteínas (equivalentes de caseína)	% de Grasa	% de Carbohidratos (equivalentes de lactosa)	% de Cenizas
YG	2.92 ± 0.96 ^a	0.70 ± 0.00 ^a	0.32 ± 0.02 ^a	0.99 ± 0.05 ^a
YPC	2.85 ± 0.19 ^a	0.76 ± 0.06 ^a	0.27 ± 0.01 ^a	1.29 ± 0.02 ^b
YPCG	2.98 ± 0.39 ^a	0.70 ± 0.00 ^a	0.29 ± 0.03 ^a	0.97 ± 0.04 ^a
YPT	3.14 ± 0.36 ^a	0.70 ± 0.00 ^a	0.26 ± 0.0 ^a	1.27 ± 0.06 ^b
YPTG	3.35 ± 0.58 ^a	0.70 ± 0.00 ^a	0.29 ± 0.04 ^a	1.43 ± 0.04 ^c

YG = Yogurt con gellan al 0.06 %, YPC = Yogurt con pectina comercial al 1 %, YPCG= Yogurt con pectina comercial al 1 % y gellan al 0.06 %, YPT = Yogurt con pectina de tempesquistle al 1 %, YPTG = Yogurt con pectina de tempesquistle al 1 % y gellan al 0.06 %. En las columnas los valores con letras distintas indican una diferencia significativa empleando la prueba de Tukey a un nivel de significancia $\alpha = 0.05$.

6.2 Determinación de pH y acidez titulable

Para determinar el tiempo óptimo del proceso de fermentación se llevó a cabo un monitoreo del pH de la reacción, estableciendo que el pH final de la mezcla debía ser de 4.5. A partir de este criterio, se logró observar que en los tratamientos que contenían pectina de tempesquistle al 1 %, pectina de tempesquistle al 1 % y gellan al 0.06 % y el tratamiento con gellan al 0.06 % presentaron un tiempo de fermentación láctica de alrededor de 4 a 5 h.

Mientras que los tratamientos con pectina comercial al 1 % y gellan al 0.06 % necesitaron 7 h de fermentación. En la Figura 3, se muestra el cambio de pH de los distintos fermentados respecto al tiempo en cada uno de los tratamientos determinados por triplicado. En todos los tratamientos se observó un cambio de color del blanco característico de la leche a un color café. Este cambio se presentó después de la adición de los agentes gelificantes en cada tratamiento. Estos resultados obtenidos difieren de lo reportado por (Skryplonek et al., 2019). Estos autores indican que los valores de pH finales de los fermentados para producir yogurt helado, se encontraron en un intervalo de 4.13 a 4.23 después de 2.5 h de fermentación, para reducir el contenido de lactosa. En el estudio emplearon un hidrocoloide k-carragenano o almidón de maíz como agentes estabilizantes con el objetivo de obtener un producto con resistencia a la fusión. La adición de estos estabilizadores no afectó la textura y el pH del producto.

En un estudio relacionado con el análisis de las características finales de 41 yogures de frutas comercializados en Pensilvania, encontraron valores de pH en el intervalo de 3.80 a 4.35 (Aryana & Olson, 2017). Estos valores reportados son similares a los reportados en el presente trabajo.

Para evaluar el comportamiento del pH durante el proceso de fermentación de cada uno de los tratamientos, se construyeron gráficas de pH *versus* tiempo. Los resultados de disminución de pH en función del tiempo se muestran en la Figura 4.



Figura 3. Monitoreo del pH para evaluar la evolución del proceso de fermentación.

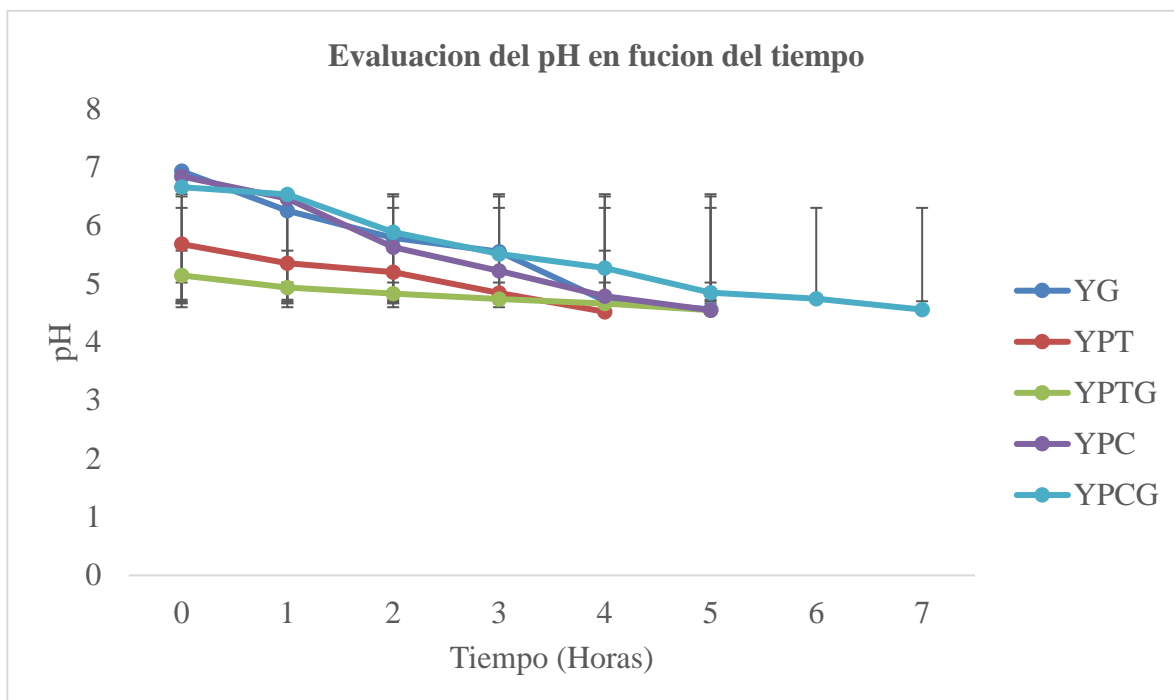


Figura 4. Evaluación del pH en función del tiempo del proceso de fermentación de los cinco tratamientos estudiados.

Los resultados obtenidos de la evaluación del pH en función del tiempo durante el proceso de fermentación permitieron establecer que la disminución de pH en los cinco tratamientos tuvo un comportamiento muy similar desde el inicio de la reacción hasta las 5 h. El

tratamiento de yogurt con pectina comercial y gellan (YPCG) requirió de un total de 7 h para alcanzar el pH deseado. Esto se debió a que el tratamiento YPCG se preparó con una pectina de alto grado de esterificación y en combinación con gellan formaron un gel de viscosidad mayor que en los otros cuatro tratamientos, provocando que las bacterias se propagaran a menor velocidad que en el resto de los tratamientos.

En el proceso de fermentación del yogurt, las bacterias pueden alcalinizar a la leche, mediante la descomposición de la albumina debido a que tiende a formar amoníaco, el cual promueve la alcalinidad del producto. Mientras que la acidez se origina principalmente por la caseína, lactoalbuminas, ácido ascórbico, citratos y fosfatos. La lactosa interviene indirectamente, solubilizando el fosfato de calcio y los citratos alcalinos. En el yogurt, el pH y la acidez titulable controlan el proceso de coagulación, la actividad de las enzimas y el desarrollo de bacterias. La lactosa se transforma en ácido láctico y como resultado el pH tiende a disminuir y esto permite la reducción de cargas negativas netas de las micelas de caseína y el fosfato de calcio coloidal, lo cual hace que su función principal sea la unión de micelas de caseínas. Los resultados de acidez titulable obtenidos para los cinco tratamientos son estadísticamente iguales, con un valor promedio de 0.45%. Estos valores son menores que los reportados por (Skryplonek et al., 2019). Estos autores reportaron un % de ácido láctico en el intervalo de 0.74 y 0.78 % en un yogurt helado sin lactosa, en el que utilizaron como estabilizadores k-carragenina y almidón de maíz. En ese estudio señalan que la concentración de estabilizadores no afecta el pH y la acidez titulable. También mencionan que la mayor acidez activa y titulable de los yogures congelados en comparación con el yogurt natural se puede explicar por la actividad fermentativa constante de las bacterias del ácido láctico durante la congelación y fusión de la muestra de yogurt. Skryplonek et al. (2019) señalan que valores superiores al 0.7 % conducen al deterioro de la calidad sensorial en los yogures.

6.3 Cuantificación de cenizas por el método de la AOAC 923.03

Esta determinación nos ayudó a cuantificar el porcentaje total de cenizas en una muestra de yogurt aplanado y una primera etapa consistió en carbonizar las muestras (Figura 4). Posteriormente, la muestra carbonizada se llevó a una mufla a temperaturas en el intervalo de 500 a 600 °C. En esta etapa los constituyentes orgánicos se oxidan exhaustivamente hasta convertirse en dióxido de carbono y dióxido de nitrógeno. Los minerales (cenizas) permanecen en el residuo en forma de óxidos, sulfatos, fosfatos y cloruros adquiriendo finalmente un color blanco en las muestras calcinadas (Figura 5).



Figura 5. Carbonización de muestra de yogurt.



Figura 6. Muestra de yogurt después de la calcinación en mufla a 550 °C.

A partir de los resultados de cenizas para los cinco tratamientos estudiados, se observa que el yogurt con pectina de tempesquistle tuvo un contenido de 1.27 ± 0.06 %, mientras que el

yogurt con pectina de tempesquistle y gellan tuvo un contenido de 1.43 ± 0.04 %. Este último mostró el contenido de cenizas más alto que el resto de los tratamientos, Tabla 1. Skryplonek et al. (2019) reportan un 0.68 ± 0.03 % de cenizas para yogurt helado. Estos resultados coinciden con los reportados por (Ban et al., 2020) para yogurt natural 0.58 ± 0.01 , yogurt con extracto de fruta del monje 0.57 ± 0.01 , yogurt con sacarosa y extracto de fruta de monje 0.60 ± 0.01 , Yogur de sacarosa 0.61 ± 0.02 . Esto muestra que los productos obtenidos en el presente estudio tienen un porcentaje más alto de minerales que los reportados tanto por Skryplonek et al. (2019) como Ban et al. (2020).

6.4 Cuantificación de grasas por el método de Gerber

El método de Gerber se utiliza para determinar el contenido de grasas en alimentos lácteos, este es un método químico debido a la adición de ácido sulfúrico (Figura 6), que es el principal causante de la separación de las proteínas de la grasa en las muestras a determinar. Esta separación se promueve con la adición de alcohol amílico. Finalmente se realiza una centrifugación en una centrífuga Gerber para obtener el porcentaje de grasas en la muestra. Cabe señalar que en esta prueba se obtuvieron resultados estadísticamente iguales para los cinco tratamientos, 0.7 % de grasas totales. Esto indica que los agentes gelificantes evaluados no contribuyeron al contenido de grasas de los yogures obtenidos, tal y como es de esperarse. Los resultados obtenidos en el presente estudio difieren significativamente con otros estudios reportados. Tal como el llevado a cabo por (Skryplonek et al., 2019), quienes reportaron un 4.8 ± 0.1 % de grasas totales. Cabe mencionar que la determinación de grasa en ese estudio fue realizada por el mismo método de Gerber. En otro estudio relacionado con la obtención de yogurt de soya se reportó un contenido de grasa de 18-19 % (Chandan et al., 2017).

También se encontró un reporte del % de grasas totales en yogures naturales de diferentes marcas en el intervalo de 0.9 a 3.7 % (Aryana & Olson, 2017).



Figura 7. Adición de ácido sulfúrico concentrado al 91 % a la muestra de yogurt para la determinación de grasa por el método de Gerber.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que el empleo del gellan combinado con pectina permiten la obtención de un yogurt bajo en grasas con características muy similares a las de un yogurt comercial. Los agentes estabilizantes juegan un papel muy importante en la fermentación del producto, lo cual ayuda a formar un yogurt muy estable, cabe mencionar que los productos obtenidos son productos bajos en grasa.



Figura 8. Resultado final de la determinación de grasa en el butirómetro de la muestra de yogurt aplanado de pectina de tempesquistle con gellan.

6.5 Determinación de Proteína por el método colorimétrico de Biuret

El método colorimétrico de Biuret es simple y rápido para la determinación cuantitativa de la concentración total de proteína. Las proteínas están compuestas por aminoácidos unidos por enlaces peptídicos en secuencia lineal generados por la condensación que ocurre entre la amina terminal de un aminoácido y el extremo carboxílico del siguiente aminoácido. Los péptidos que contienen tres o más residuos de aminoácidos forman un complejo colorido con iones cúpricos en un ambiente alcalino que contiene tartrato de sodio y potasio. Esto también sucede con el compuesto orgánico de Biuret ($\text{NH}_2\text{-CO-NH-CO-NH}_2$) en presencia de un ion cúprico. La reacción en la que se forma un complejo colorido con enlaces peptídicos en presencia de una solución alcalina de sulfato cúprico se conoce como la reacción de Biuret, la cual se muestra en la Figura 9.

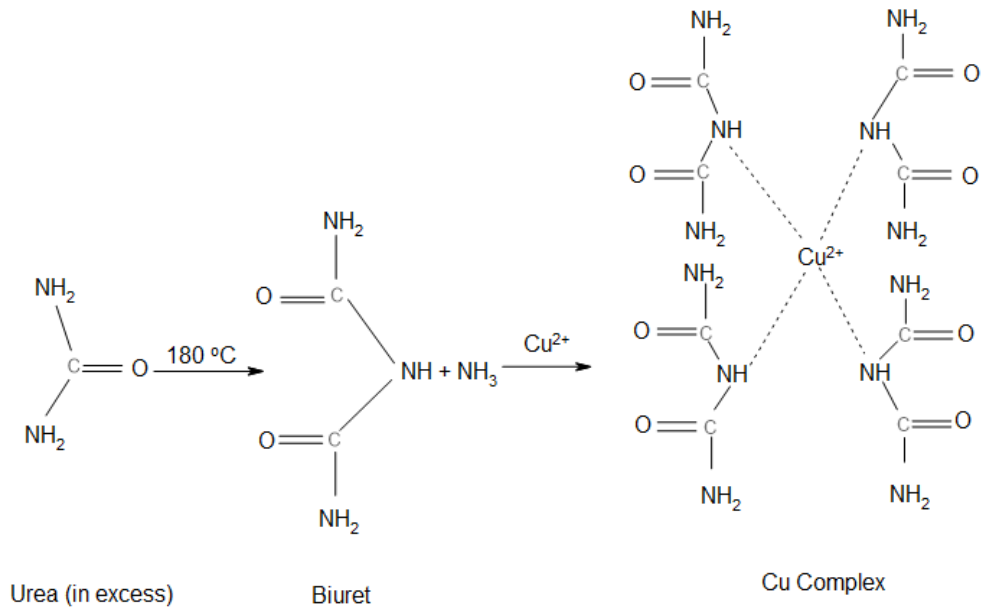


Figura 9. Esquema de la reacción de Biuret (Krohn, 2002).

En el presente estudio, las muestras obtenidas de los cinco tratamientos evaluados con la reacción de Biuret se llevaron a cabo en una microplaca de 96 pozos con capacidad de 120 μL c/u, Figura 10.

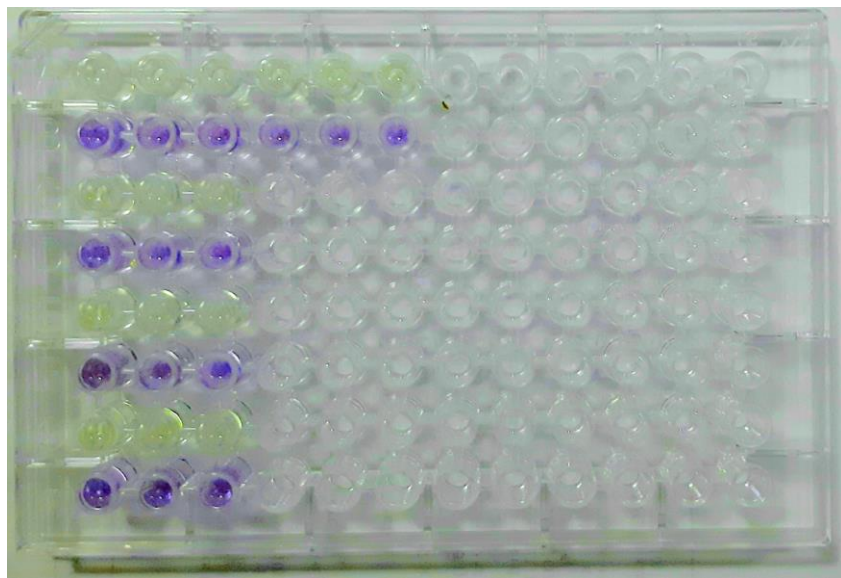


Figura 10. Determinación de proteínas por el método de Biuret de los 5 tratamientos realizados. Cada tratamiento se realizó por triplicado con su respectivo blanco.

Los resultados de la cuantificación de proteínas en los yogures obtenidos a partir de los cinco tratamientos evaluados en el presente estudio muestran que el contenido de proteína (caseína) se encuentra en el intervalo de 2.85-3.35 % sin diferencias significativas entre muestras. Estos valores están cercanos a los reportados por (Aryana & Olson, 2017) quienes reportan un contenido de proteínas en yogurt con frutas en el intervalo de 3.09 y 5.38 %. Cabe señalar que estos productos se obtuvieron a partir de una leche bronca. Por otra parte (Ban et al., 2020) reporta el contenido de proteínas para yogures preparados a partir de cuatro distintos tratamientos, yogurt natural, yogurt preparado con extracto de fruta del monje, yogurt preparado con extracto de fruta del monje-sacarosa y yogurt de sacarosa. El contenido de proteína reportado para estos productos se encuentra en el intervalo de 3.31-3.35 %. Estos últimos valores se aproximan más a los obtenidos en el presente trabajo.

6.6 Determinación de Carbohidratos por el método colorimétrico Somogyi-Nelson

Se han desarrollado varios métodos colorimétricos para cuantificar azúcares reductores incluyendo el método de Somogyi-Nelson. Este método está basado principalmente en la capacidad de reducción de los azúcares reductores en presencia de cobre en una solución alcalina. En este ensayo se utilizan iones cuprosos para reducir el complejo de arsenomolibdato que a la vez fue formado por la reacción de molibdato de amonio con arseniato de sodio para generar el color azul característico del molibdeno. Este método fue adaptado para medir el poder reductor que tienen los azúcares reductores y permite también cuantificar azúcares reductores. El contenido de azúcares de los productos obtenidos a partir de los cinco tratamientos se encuentra en el intervalo de 0.26 a 0.32 %. Estos valores están muy por debajo de los reportados por (Ban et al., 2020), quienes reportan un contenido de azúcares en el intervalo de 7.2 a 13.3 %. Esta diferencia se debe a que Ban et al., (2020)

realizaron un producto con leche que contenía de 35 a 70 g de lactosa por litro de leche. Consecuentemente, el producto final presentó un porcentaje alto en carbohidratos respecto a los del presente estudio. Cabe recordar que la leche empleada en el presente trabajo fue baja en carbohidratos.

7. CONCLUSIÓN

A partir de los resultados obtenidos se puede confirmar que los tratamientos de yogurt con agentes gelificantes estudiados mostraron resultados similares en composición nutricional. En el estudio se utilizaron dos pectinas una pectina cítrica de alto grado de esterificación (comercial) y otra aislada del fruto verde de tempesquistle de bajo grado de esterificación. Estas pectinas resultaron ser importantes para promover la estabilidad de los yogures elaborados. El contenido de grasa y carbohidratos en los productos obtenidos fue bajo. Mientras que el contenido de proteína fue similar al reportado para yogures naturales. Por lo tanto, los yogures obtenidos a partir de los cinco tratamientos realizados se consideran como un producto dietético debido al bajo contenido de grasa y carbohidrato. Los yogures que se obtuvieron a partir de la combinación de pectina, tanto cítrica como de tempesquistle, con gellan mostraron una mejor consistencia de yogurt afluado que los preparados ya sea con pectina o gellan por separado.

En estudios posteriores se recomienda realizar la digestibilidad *in vitro* de los yogures obtenidos en el presente trabajo para evaluar su bioaccesibilidad.

8. BIBLIOGRAFÍA

- A. Y. Tamime, R. K. . R. (1999). *YOGHURT: Science and technology*. USA: Woodhead.
- Arioui, F., Saada, D. A., & Cheriguene, A. (2017). Physicochemical and sensory quality of yogurt incorporated with pectin from peel of Citrus sinensis. In Y. M. Lo (Ed.), *Food Science y Nutrition* (pp. 358–364). <https://doi.org/10.1002/fsn3.400>
- Aryana, K. J., & Olson, D. W. (2017). *A 100-Year Review : Yogurt and other cultured dairy products 1*. 9987–10013.
- AY Tamime. (2006). *Fermented Milks* (A. Tamime, ed.). Reino Unido: Blackwell Science.
- Badertscher, Ñ., Berger, T., & Kuhn, R. (2007). Densitometric determination of the fat content of milk and milk products. *International Dairy Journal*, 17(1), 20–23. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.12.013>
- Ban, Q., Liu, Z., Yu, C., Sun, X., Jiang, Y., Cheng, J., & Guo, M. (2020). Physicochemical, rheological, microstructural, and antioxidant properties of yogurt using monk fruit extract as a sweetener. *Dairy Science*. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18703>
- Behare, P., Kumar, H., & Mandal, S. (2016). Yogurt : Yogurt Based Products. In B. Caballero, P. M. Finglas, & F. Toldrá (Eds.), *Enciclopedia de alimentos y salud* (pp. 625–631). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00767-4>
- Boiarkina, I., Young, B., Information, I., Centre, C., & Engineering, M. (2019). The Structure and Rehydration Properties of Dairy Powders. In N. Z. F. S. Laurence Melton Emeritus Professor, University of Auckland, C. P. V. Memorial University of Newfoundland, & O. Shimadzu Scientific (Eds.), *The Structure and Rehydration Properties of Dairy Powders* (Vol. 3, pp. 55–60). <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.21693-4>
- Buldo, P., Benfeldt, C., Carey, J. P., Folkenberg, D. M., Jensen, H. B., Sieuwerts, S., Ipsen, R. (2016). Interactions of milk proteins with low and high acyl gellan: Effect on microstructure and textural properties of acidified milk. *Food Hydrocolloids*, 60, 225–231. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.03.041>
- Buttriss, J. (1997). Nutritional properties of fermented milk products. *International Journal of Dairy Technology*, 50(1), 21–27. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.1997.tb01731.x>
- Chandan, R. C., Gandhi, A., & Shah, N. P. (2017). 1.1 introduction. In N. P. Shah (Ed.), *Yogurt in Health and Disease Prevention* (pp. 3–29). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805134-4.00001-8>
- Chandan, R. C., & Services, H. (2017). An overview of yogurt production and composition. In N. P. Shah (Ed.), *Yogurt en Salud y Prevención de Enfermedades* (pp. 31–47). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805134-4.00002-X>
- Cogan, T. M., & Hill, C. (1993). Cheese Starter Cultures. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* (pp. 193–255). https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2650-6_6
- Das, K., Choudhary, R., & Thompson-witrick, K. A. (2019). Effects of new technology on the current manufacturing process of yogurt-to increase the overall marketability of yogurt. *LWT - Food Science and Technology*, 108(February), 69–80. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.03.058>
- Elise, C., Abrahamsen, R. K., Rukke, E., Kristian, T., Johansen, A., & Skeie, S. B. (2019). Processing of high-protein yoghurt e A review. *International Dairy*, 88, 42–59. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.08.002>

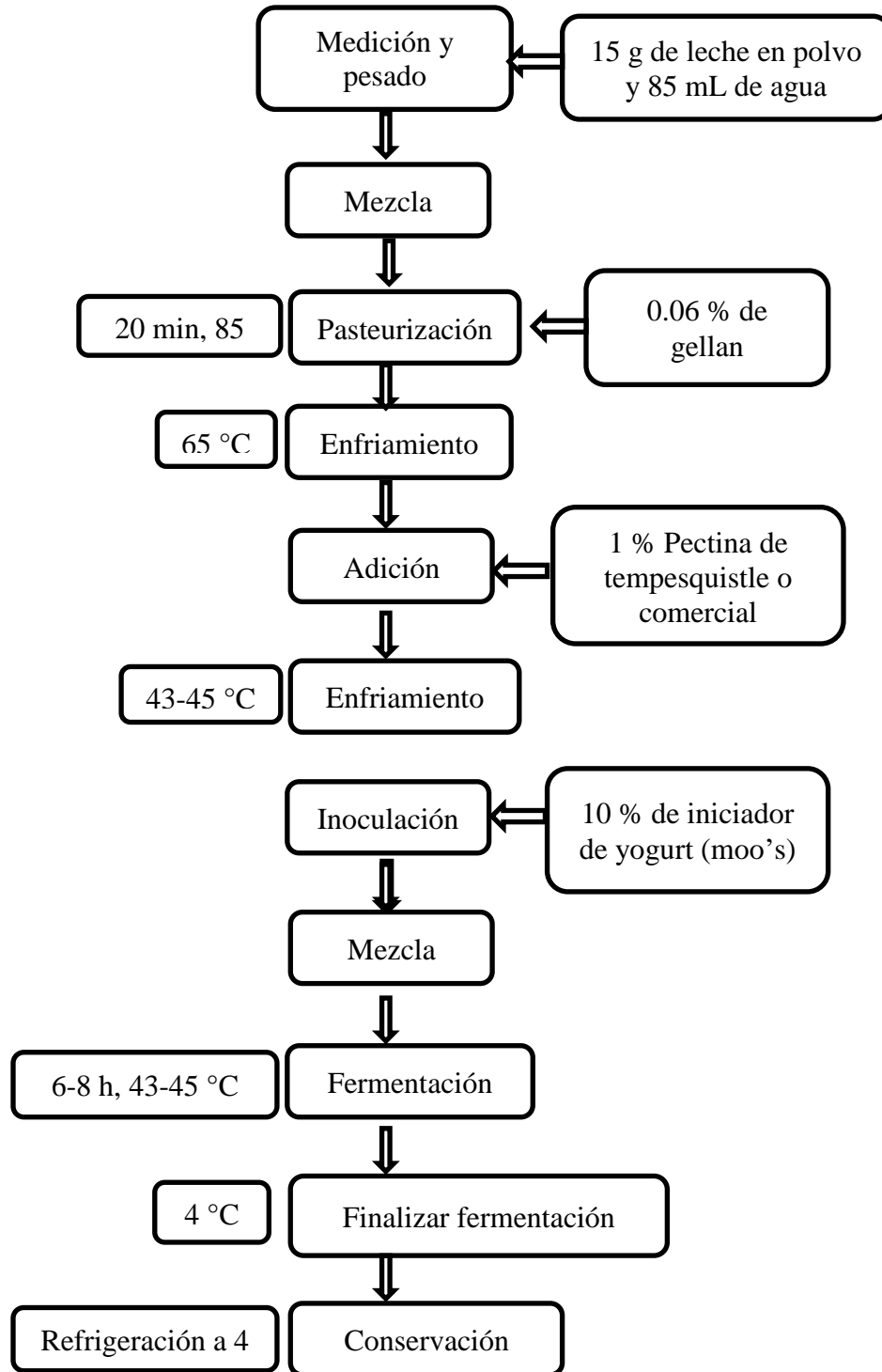
- Fabro, M. A., Milanesio, H. V., Robert, L. M., Speranza, J. L., Murphy, M., Rodríguez, G., & Castañeda, R. (2006). Technical Note: Determination of acidity in whole raw milk: Comparison of results obtained by two different analytical methods. *Journal of Dairy Science*, 89(3), 859–861. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72149-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72149-X)
- Fernández, M. F., Boris, S., & Barbés, C. (2005). Safety evaluation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* UO 004, a probiotic bacterium. *Research in Microbiology*, 156(2), 154–160. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2004.09.006>
- Hill, D., Ross, R. P., Arendt, E., & Stanton, C. (2017). Microbiology of Yogurt and Bio-Yogurts Containing Probiotics and Prebiotics. In N. P. Shah (Ed.), *Yogurt in Health and Disease Prevention* (pp. 69–85). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805134-4.00004-3>
- Holzappel, W. H., & Wood, B. (Eds.). (2014). *Lactic acid bacteria: biodiversity and taxonomy* (John Wiley).
- Horne, D. S. (1999). Formation and structure of acidified milk gels. *International Dairy Journal*, 9(3–6), 261–268. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(99\)00072-2](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(99)00072-2)
- Kanatani, K., & Oshimura, M. (1994). Isolation and structural analysis of the phospho- β -galactosidase gene from *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 78(2), 123–129. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(94\)90249-6](https://doi.org/10.1016/0922-338X(94)90249-6)
- Kieserling, K., Vu, T. M., Drusch, S., & Schalow, S. (2019). Impact of pectin-rich orange fibre on gel characteristics and sensory properties in lactic acid fermented yoghurt. *Food Hydrocolloids*, 94(November 2018), 152–163. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.02.051>
- Krohn, R. I. (2002). The Colorimetric Detection and Quantitation of Total Protein. *Current Protocols in Cell Biology*, 15(1), A.3H.1-A.3H.28. <https://doi.org/10.1002/0471143030.cba03hs15>
- Lauber, S., Klostermeyer, H., & Henle, T. (2001). On the influence of non-enzymatic crosslinking of caseins on the gel strength of yoghurt. *Nahrung - Food*, 45(3), 215–217. [https://doi.org/10.1002/1521-3803\(20010601\)45:3<215::aid-food215>3.3.co;2-t](https://doi.org/10.1002/1521-3803(20010601)45:3<215::aid-food215>3.3.co;2-t)
- Lawrence, R. C., Thomas, T. D., & Terzaghi, B. E. (1976). Reviews of the progress of Dairy Science: Cheese starters. *Journal of Dairy Research*, 43(1), 141–193. <https://doi.org/10.1017/S0022029900015703>
- Lee, W. J., & Lucey, J. A. (2003). Rheological properties, whey separation, and microstructure in set-style yogurt: Effects of heating temperature and incubation temperature. *Journal of Texture Studies*, 34(5–6), 515–536. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4603.2003.tb01079.x>
- Liu, J., Li, T., Song, Y., & Wang, F. (2018). Improvement in the quantification of reducing sugars by miniaturizing the Somogyi-Nelson assay using a microtiter plate. *Food Chemistry*, 240, 898–903. <https://doi.org/10.1002/chem.201801764>
- Liu, K. (2019). Effects of sample size, dry ashing temperature and duration on determination of ash content in algae and other biomass. *Algal Research*, 40(April), 101486. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101486>
- Lucas-gonzález, R., Viuda-martos, M., Pérez-alvarez, J. A., & Fernández-lópez, J. (2018). In vitro digestion models suitable for foods: Opportunities for new fields of application and challenges. *Food Research International*, 107(February), 423–436. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.055>
- Lucey, J. A. (2002). Formation and physical properties of milk protein gels. *Journal of Dairy Science*, 85(2), 281–294. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74078-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74078-2)
- Lucey, J. A., & Singh, H. (2003). Acid Coagulation of Milk. In *Advanced Dairy Chemistry*

- (Vol. 1, pp. 1001–1025). https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8602-3_28
- Marshall, V. M. E., & Gallardo, F. (1993). Yogurt Production from Reconstituted Skim Milk Powders using Different Polymer and Non-Polymer Forming Starter Cultures. *Journal of Dairy Research*, 60(2), 247–254. <https://doi.org/10.1017/S0022029900027564>
- Mayo, B., Aleksandrzyk - Piekarczyk, T., Fernández, M., Kowalczyk, M., Álvarez - Martín, P., & Bardowski, J. (2010). Updates in the metabolism of lactic acid bacteria. In *Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel applications* (pp. 3–33).
- Mellema, M., Walstra, P., Van Opheusden, J. H. J., & Van Vliet, T. (2002). Effects of structural rearrangements on the rheology of rennet-induced casein particle gels. *Advances in Colloid and Interface Science*, 98(1), 25–50. [https://doi.org/10.1016/S0001-8686\(01\)00089-6](https://doi.org/10.1016/S0001-8686(01)00089-6)
- Morell, P., Piqueras-fizman, B., Hernando, I., & Fizman, S. (2015). How is an ideal satiating yogurt described? A case study with added-protein yogurts. *Food Research International*, 78(December), 141–147. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.10.024>
- Nagaraj, M., Sharanagouda, B., Manjunath, H., & Manafi, M. (2009). Standardization of different levels of lactose hydrolysis in the preparation of lactose hydrolyzed yoghurt. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 10(2), 132–136.
- Naqash, F., Masoodi, F. A., Rather, S. A., Wani, S. M., & Gani, A. (2017). Emerging concepts in the nutraceutical and functional properties of pectin — A Review. *Carbohydrate Polymers*, 168, 227–239. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.03.058>
- Nielsen, S. S. (2009). Food analysis Laboratory Manual. In *The Journal of nutrition* (Third, Vol. 7). <https://doi.org/10.3329/jbau.v7i1.4985>
- Nielsen, S. S. (2017). *Food Analysis* (Fifth). <https://doi.org/10.1038/1841347a0>
- Oliveira, M. N. De, & Paulo, S. (2014). Fermented Milks and Yogurt. *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition*, 2(April), 784–791. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00121-X>
- Özer, B., Robinson, R. y G. (2002). *Effect of elevation of total solids by ultra-filtration and reverse osmosis on thiol groups in milk.*
- Patton, S., & Jensen, R. G. (1975). Lipid metabolism and membrane functions of the mammary gland. *Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids*, 14(C), 163–170. [https://doi.org/10.1016/0079-6832\(75\)90004-X](https://doi.org/10.1016/0079-6832(75)90004-X)
- Perring, L., & Tschopp, A. (2019). Determination of ash content of milk-based powders by Energy Dispersive X-ray Fluorescence. *Microchemical Journal*, 145(July 2018), 162–167. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.10.025>
- Poolman, B., & Knol, J. (1999). Amplified expression and membrane reconstitution of transport proteins. *Biochemical Society Transactions*, 27(6), 912–917. <https://doi.org/10.1042/bst0270912>
- Rodgers, S. (2001). Preserving non-fermented refrigerated foods with microbial cultures—a review. *Trends in Food Science & Technology*, 12(8), 276–284. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(01\)00093-0](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(01)00093-0)
- Schmidt, C., Mende, S., Jaros, D., & Rohm, H. (2016). Fermented milk products: effects of lactose hydrolysis and fermentation conditions on the rheological properties. *Dairy Science and Technology*, 96(2), 199–211. <https://doi.org/10.1007/s13594-015-0259-9>
- Shiby, V. K., & Mishra, H. N. (2013). Fermented Milks and Milk Products as Functional Foods-A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(5), 482–496. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.547398>

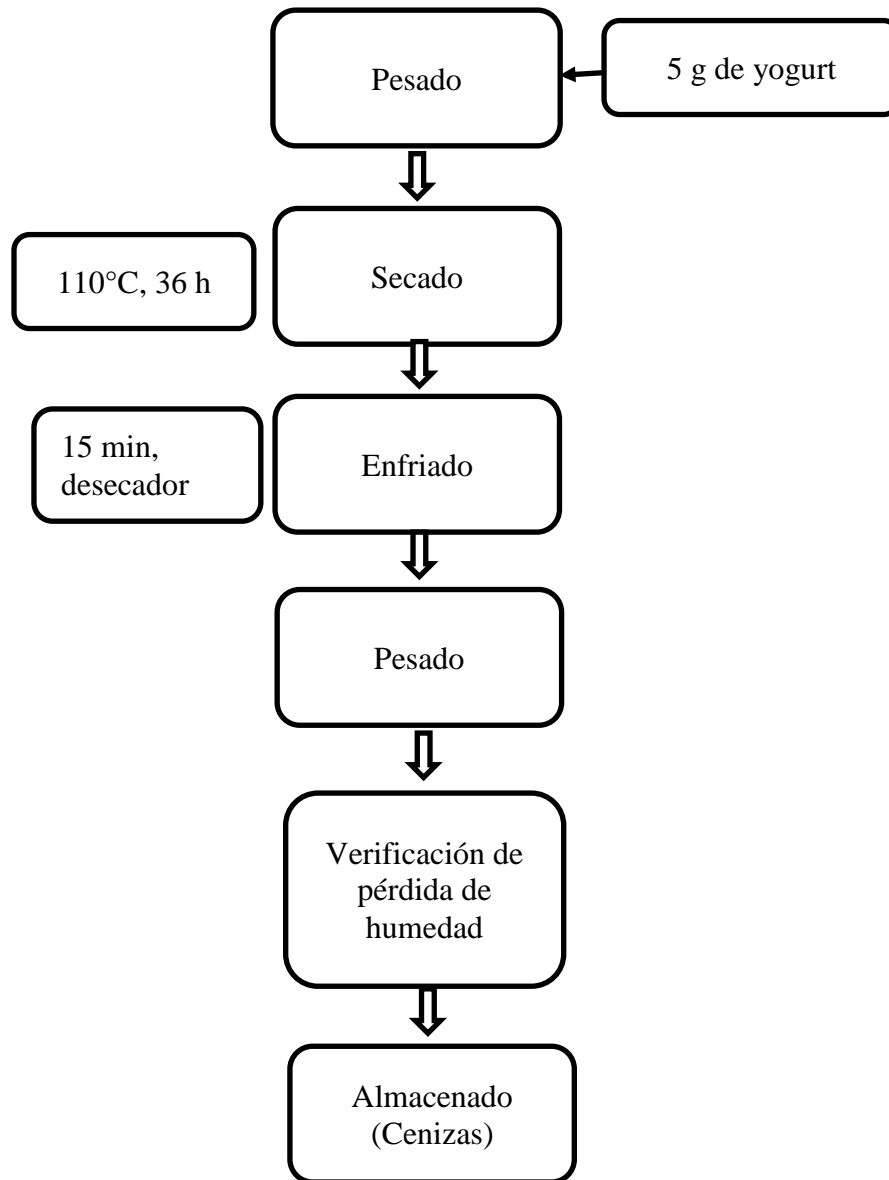
- Shin, J. M., & Park, S. K. (2015). Comparison of fat determination methods depending on fat definition in bakery products. *LWT - Food Science and Technology*, *63*(2), 972–977. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.04.011>
- Sieuwert, S., De Bok, F. A. M., Hugenholtz, J., & Van Hylckama Vlieg, J. E. T. (2008). Unraveling microbial interactions in food fermentations: From classical to genomics approaches. *Applied and Environmental Microbiology*, *74*(16), 4997–5007. <https://doi.org/10.1128/AEM.00113-08>
- Skryplonek, K., Henriques, M., Gomes, D., Viegas, J., Fonseca, C., Pereira, C., ... Mituniewicz-Malek, A. (2019). Characteristics of lactose-free frozen yogurt with κ -carrageenan and corn starch as stabilizers. *Journal of Dairy Science*, *102*(9), 7838–7848. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16556>
- Surono, I. S. (2003). In vitro probiotic properties of indigenous dadih lactic acid bacteria. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, *16*(5), 726–731. <https://doi.org/10.5713/ajas.2003.726>
- Tamime, A. Y. (2002). Fermented milks: A historical food with modern applications—a review. *European Journal of Clinical Nutrition*, *56*, S2–S15. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601657>
- Tamime, A. Y., & Marshall, V. M. E. (1997). Microbiology and technology of fermented milks. *Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk*, 57–152. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-1121-8_3
- Torres, O., Yamada, A., Rigby, N. M., Hanawa, T., Kawano, Y., & Sarkar, A. (2019). Gellan gum: A new member in the dysphagia thickener family. *Biotribology*, *17*(February), 8–18. <https://doi.org/10.1016/j.biotri.2019.02.002>
- Vasbinder, A. J., Alting, A. C., Visschers, R. W., & De Kruif, C. G. (2003). Texture of acid milk gels: Formation of disulfide cross-links during acidification. *International Dairy Journal*, *13*(1), 29–38. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(02\)00141-3](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(02)00141-3)
- Ye, A., Singh, H., Oldfield, D. J., & Anema, S. (2004). Kinetics of heat-induced association of β -lactoglobulin and α -lactalbumin with milk fat globule membrane in whole milk. *International Dairy Journal*, *14*(5), 389–398. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2003.09.004>

9. APÉNDICES

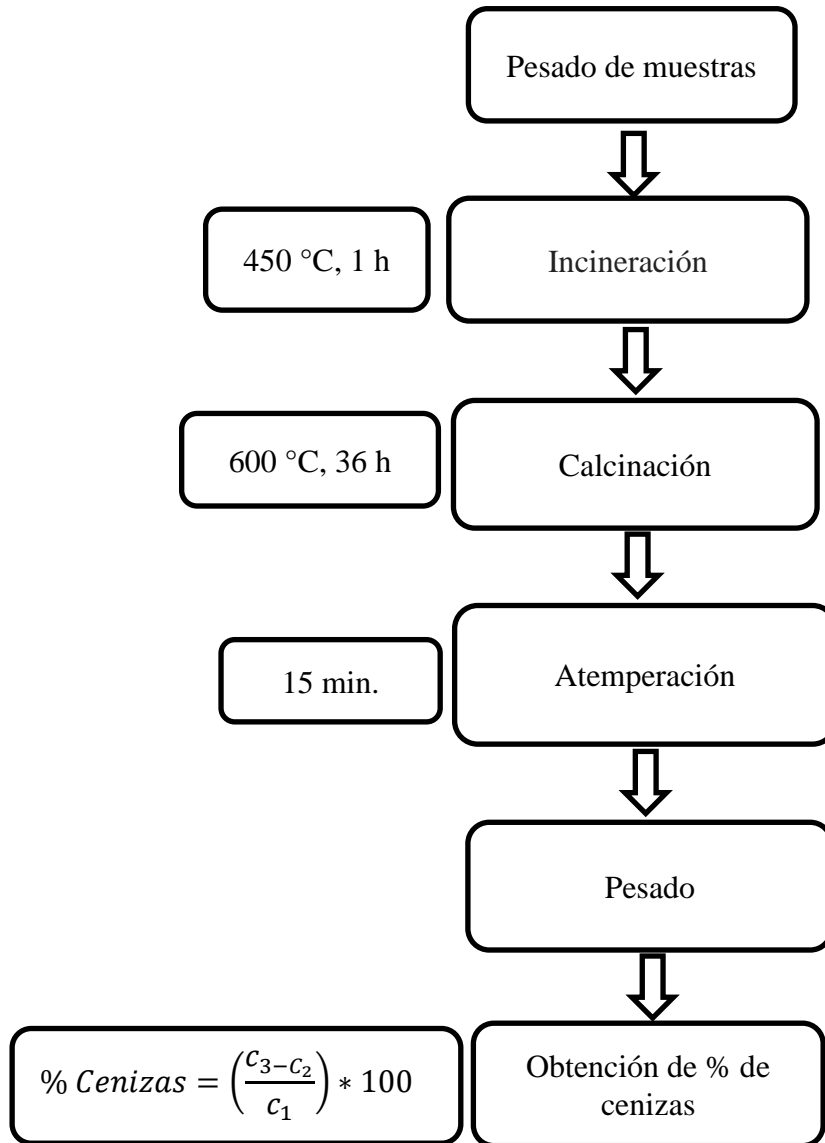
Apéndice 1. Diagrama de proceso para la elaboración de yogurt



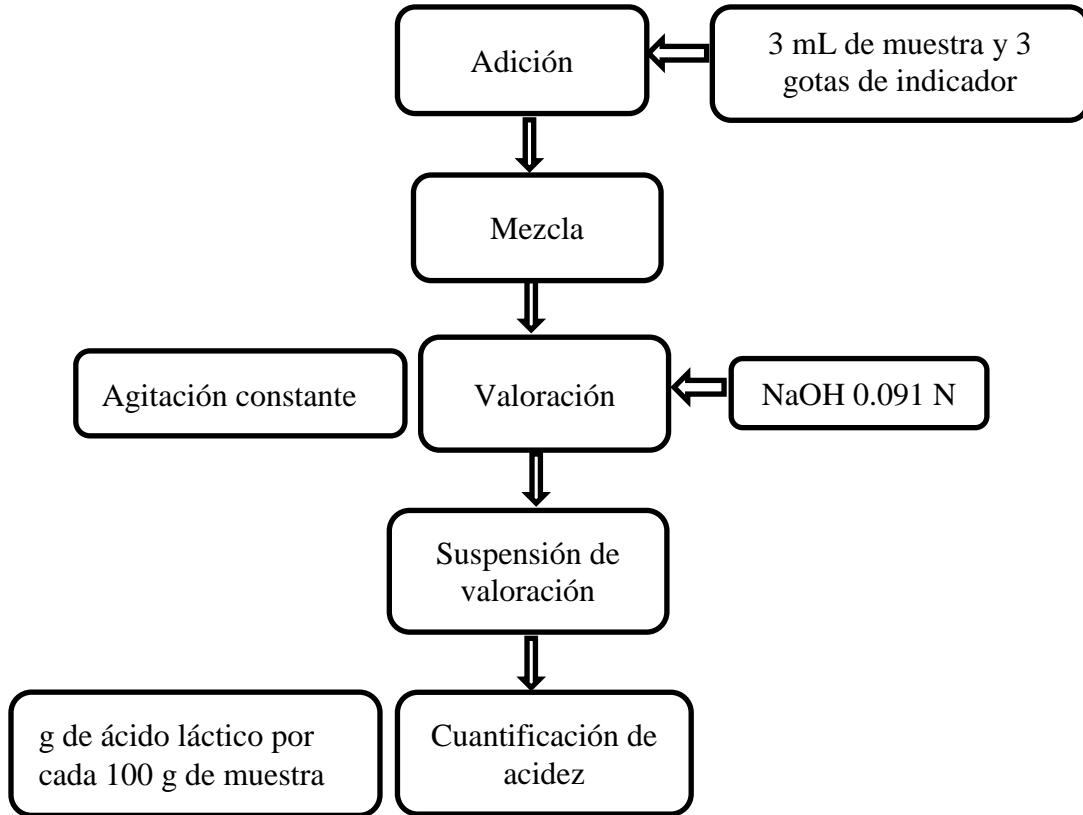
Apéndice 2. Determinación de humedad



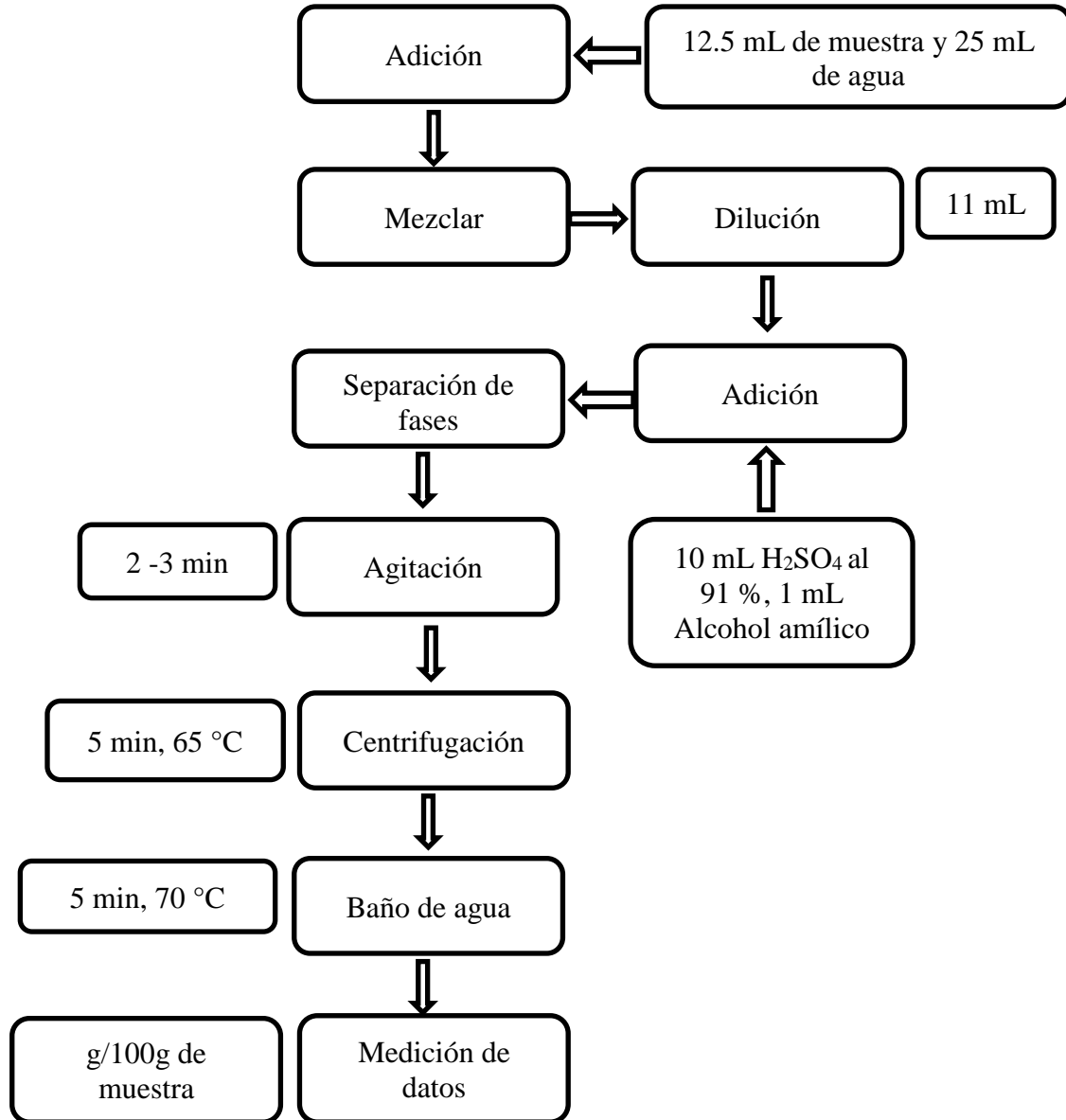
Apéndice 3. Cuantificación de cenizas



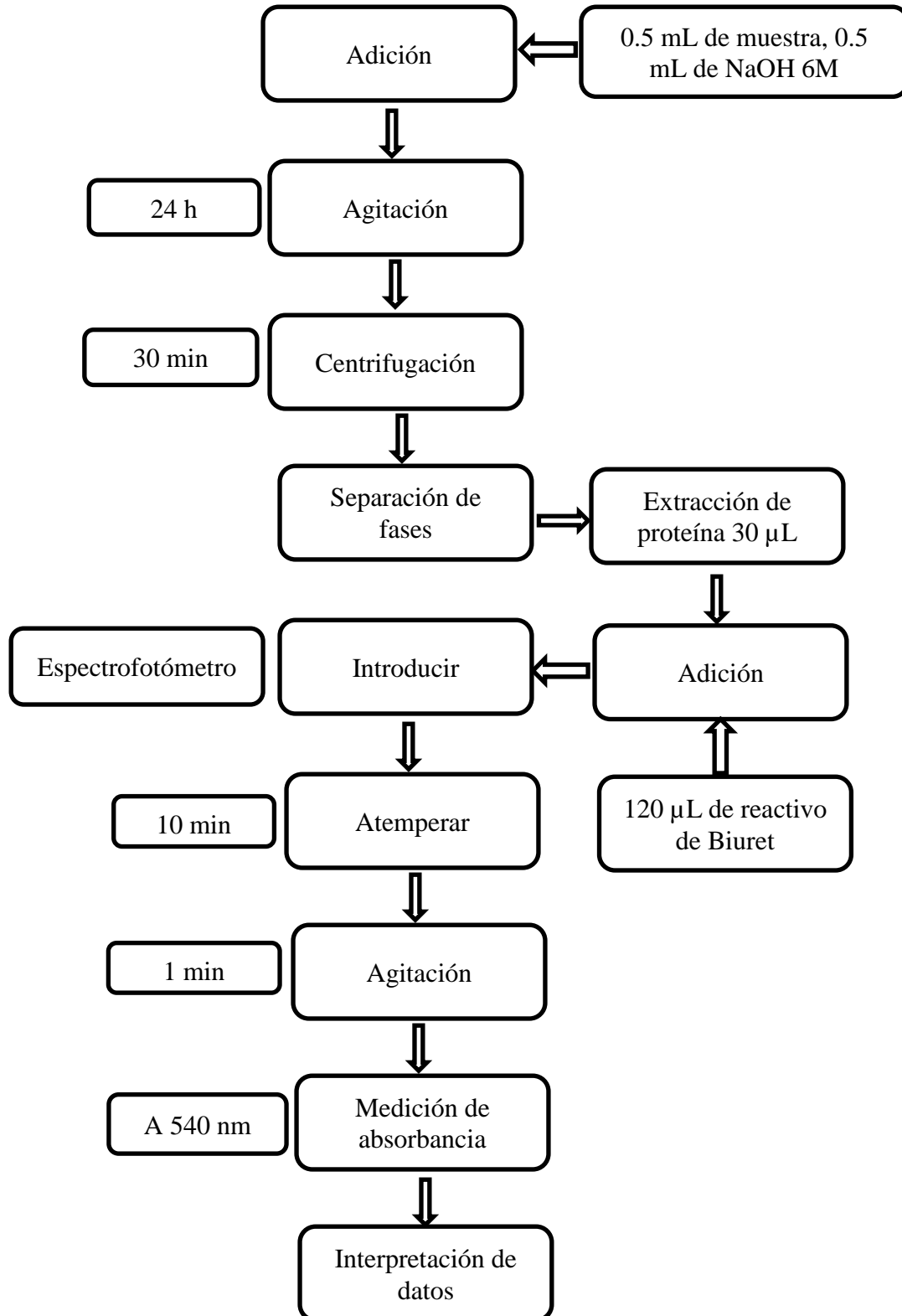
Apéndice 4. Determinación de acidez titulable



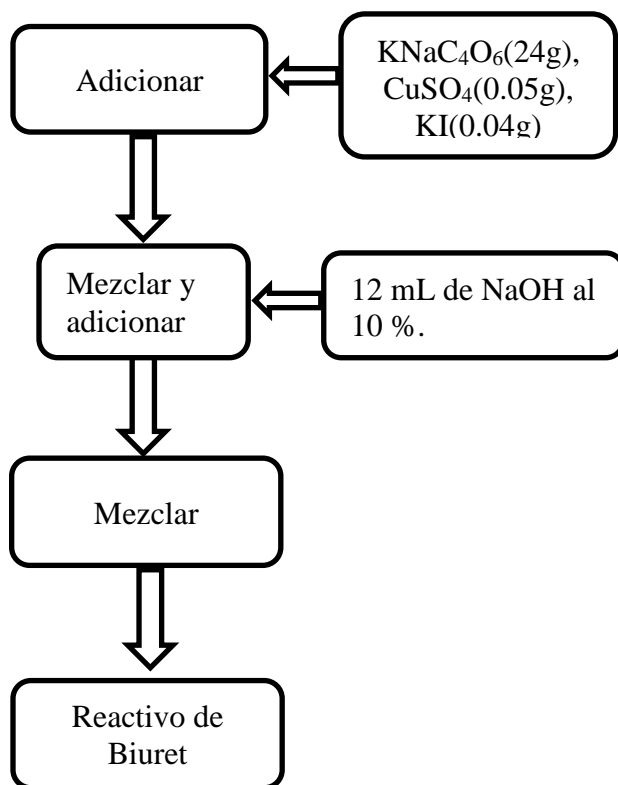
Apéndice 5. Determinación de grasa por el método de Gerber



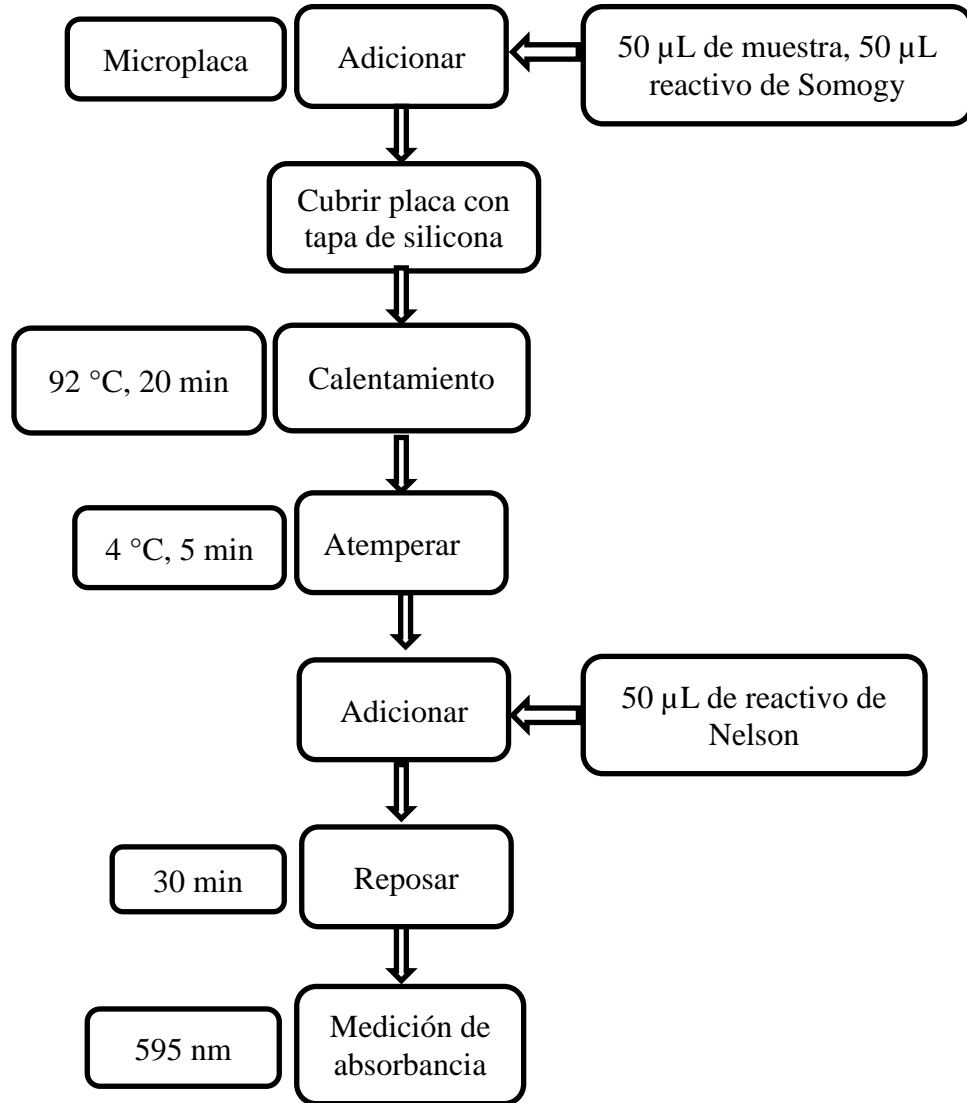
Apéndice 6. Cuantificación de proteínas por el método de Biuret



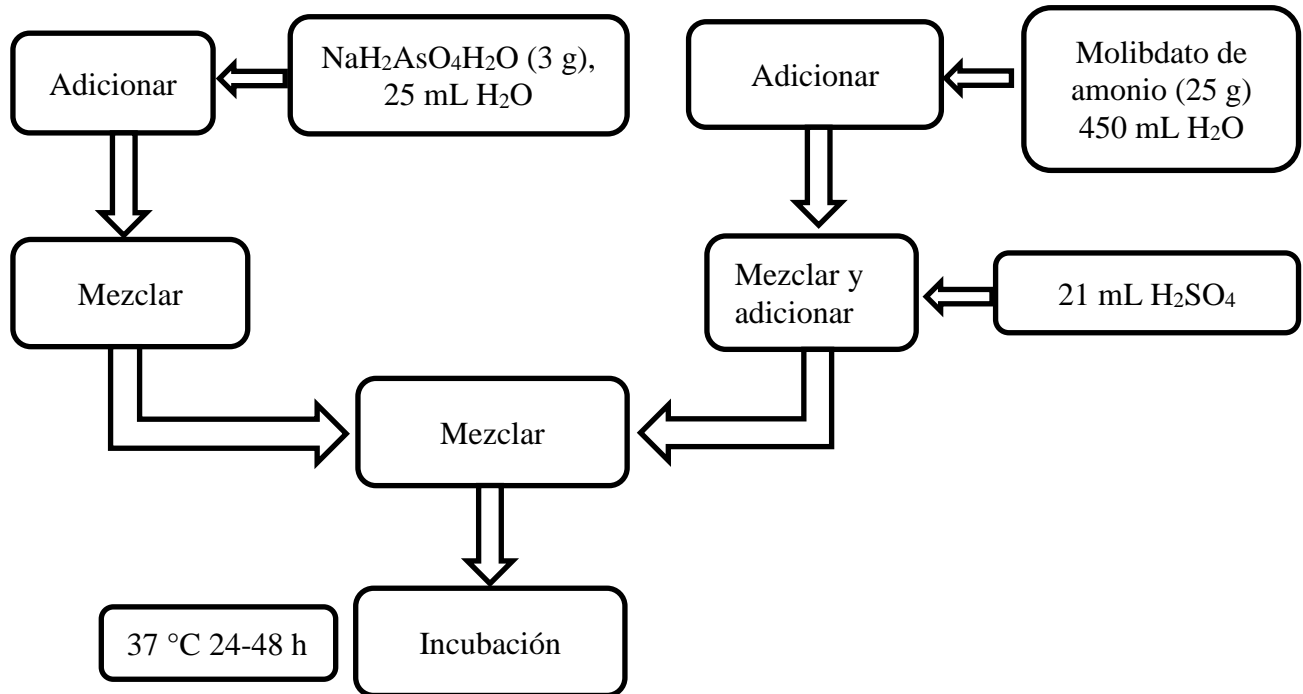
Apéndice 7. Preparación del reactivo de trabajo de Biuret.



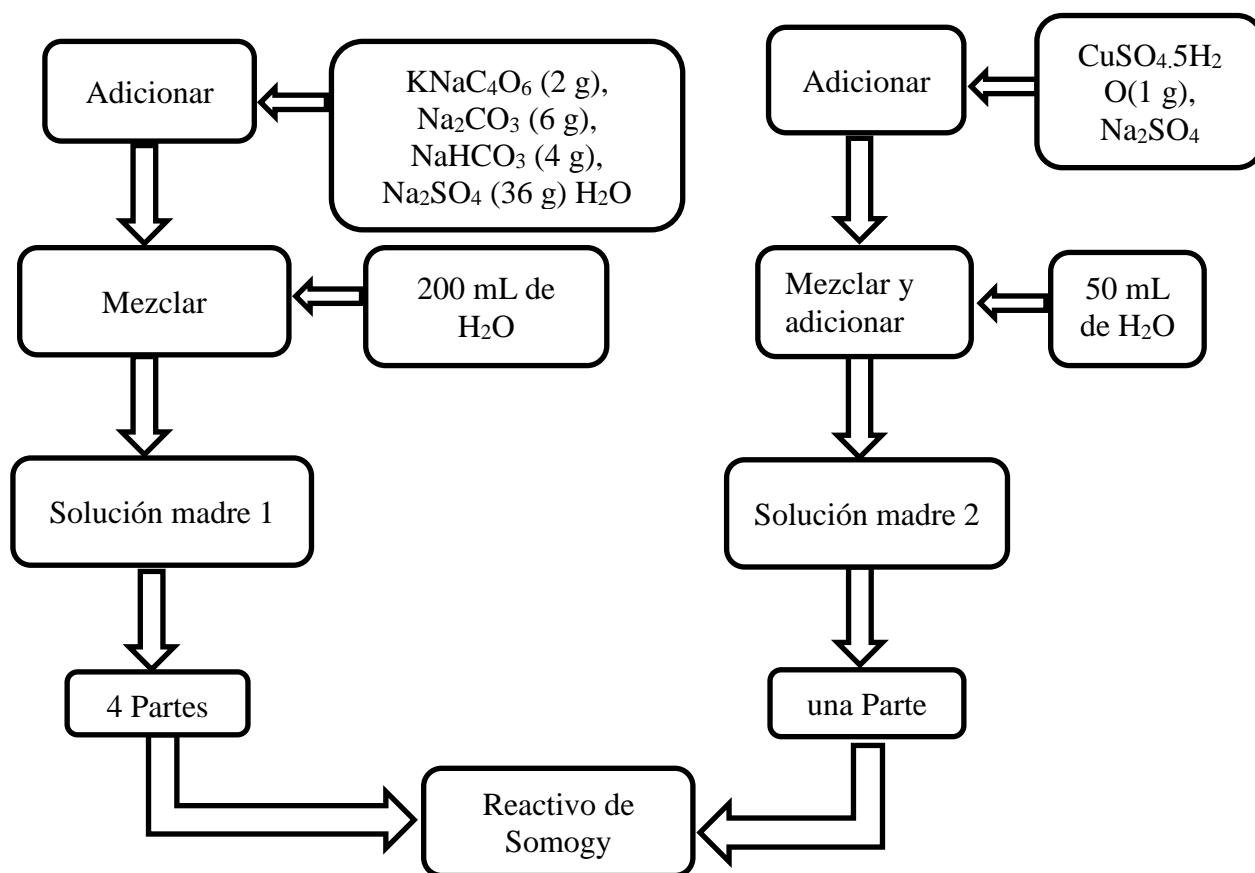
Apéndice 8. Determinación de carbohidratos por el método de Somogy-Nelson



Apéndice 9. Preparación del reactivo de Nelson



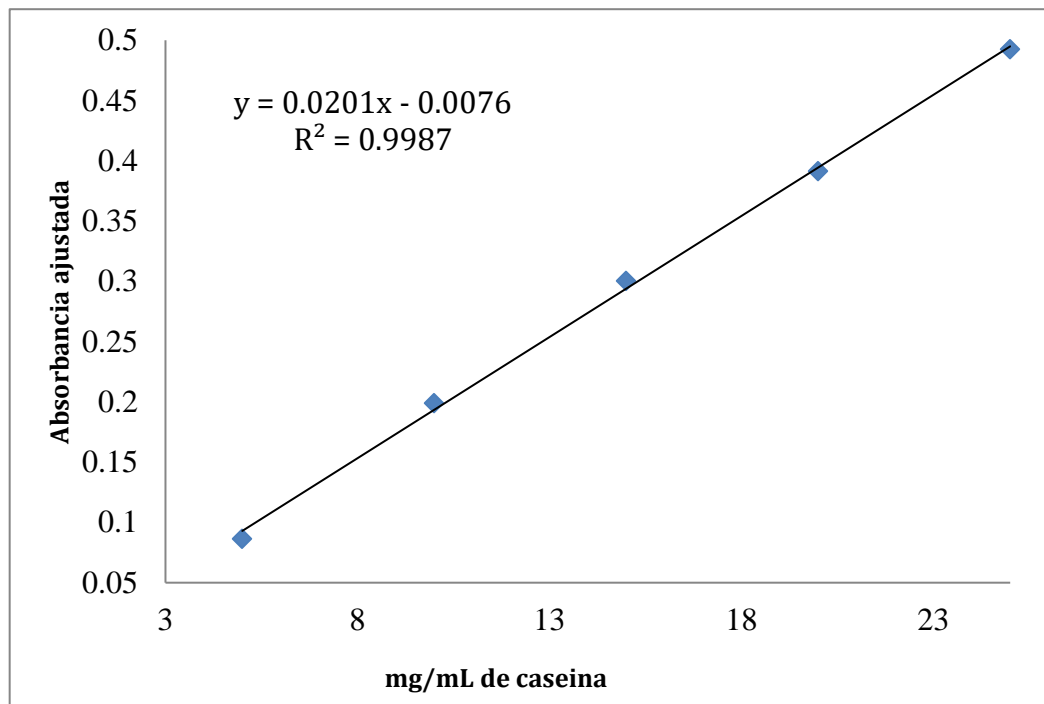
Apéndice 10. Preparación del reactivo de Somogyi



Apéndice 11. Obtención de yogurt en un intervalo de pH de 4.2-4.5.



Apéndice 12. Curva de calibración para la determinación de proteína por el método de Biuret.



Apéndice 13. Curva de calibración para la determinación de carbohidratos por el método de Somogyi-Nelson.

