

PROYECTO FINAL DE INGENIERÍA

CARACTERIZACIÓN TÉCNICA DE DISTINTOS CULTIVOS COMERCIALES APLICADOS A YOGUR BEBIBLE.

Nigro, Estefanía Soledad – LU 1026644

Ingeniería en Alimentos

Nugnes, Rodrigo Gastón – LU 1026712

Ingeniería en Alimentos

Tutora:

Ing. Bruno, Viviana Ester, Chr. Hansen

Co-Tutores:

Ing. Piña, Martín Leonardo, UADE

Lic. Pérez, Adriana Alicia, UADE.

Colaboradora:

Lic. Guzmán, María Leticia, Chr. Hansen

Agosto 07, 2018



**UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA
FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS EXACTAS**

Agradecimientos

Queremos agradecer a todos los que hicieron posible este trabajo de investigación, en especial a todo el personal de Chr. Hansen por su apoyo y ayuda a la hora de desarrollar este proyecto, capacitándonos en el tema y brindándonos las herramientas necesarias para el correcto desarrollo de esta investigación. Particularmente a nuestra tutora, Ing. Viviana Bruno, quien nos abrió las puertas de la empresa para realizar este proyecto y a la Lic. Leticia Guzmán quien nos entrenó para el desarrollo del mismo.

Por otro lado, queremos agradecer al Ing. Martín Piña, quien se entusiasmó desde un comienzo con este proyecto y nos brindó la ayuda necesaria para que este proyecto se lleve a cabo.

Queremos dar las gracias a nuestra Co Tutora y docente Lic. Adriana Pérez, por su gran colaboración en el análisis bioestadístico, el cual fue indispensable para la elaboración de este trabajo. De igual manera, quisiéramos hacer extensiva nuestra gratitud al Dr. Federico Prada quién nos dio un panorama inicial muy claro sobre la condensación estadística de los datos, para luego contactarnos con Adriana. A la vez, a la profesora Silvia Raffellini quien nos ayudó en el análisis de los datos microbiológicos.

Por último, agradecer a nuestras familias por apoyarnos a lo largo de toda nuestra carrera y en este proyecto.

Resumen

El objetivo de este trabajo de investigación fue realizar un mapeo técnico de cultivos de bacterias ácido lácticas (combinación de *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*) aplicadas a yogur bebible, bajo condiciones de proceso similares a las utilizadas en la industria láctea de Latinoamérica. Partiendo de una base blanca estándar para yogures bebibles, se analizó el impacto que tienen los distintos cultivos en el producto final, como así también, la implicancia que tiene la modificación de algún parámetro de proceso sobre los productos realizados a partir del mismo cultivo.

Para este proyecto se seleccionaron cuatro cultivos. Se realizó el proceso productivo de yogur bebible a escala piloto, utilizando dos temperaturas de enfriamiento (24°C y 10°C) y dos temperaturas de almacenamiento (25°C y 10°C), obteniéndose así 4 productos finales por cada tipo de cultivo. Se estudiaron los siguientes parámetros: cinética de acidificación, número de bacterias ácido lácticas viables, post acidificación y reometría durante la vida útil del producto. Tanto el proceso productivo como el seguimiento del yogur se realizaron por triplicado y se utilizó un software estadístico para el procesamiento de los datos (InfoStat).

Los cultivos utilizados, manteniendo idéntica base y parámetros de producción, impactaron significativamente en todos los parámetros analizados ($p < 0,05$), exceptuando el recuento de *St. salivarius ssp. thermophilus*.

Por otra parte, se demostró cómo impacta el cambio de ciertos parámetros de proceso en el producto final. La temperatura de enfriamiento no impactó en la post acidificación ni en la reometría, mientras que la de almacenamiento tuvo influencia significativa en la post acidificación ($p < 0,05$).

Palabras claves: yogur bebible, cultivos, post acidificación, reometría, bacterias ácido lácticas.

Abstract

The objective of this research was to carry out a technical mapping of different lactic acid bacteria's cultures (combination of *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*) applied to drinking yoghurt, under process conditions similar to those used in dairy industry in LatinAmerica. Starting from a standard white base for drinking yoghurts, the impact that the different cultures have on the final product was analyzed, as well as the implication that the modification of some parameters have on the products derived from the same cultures.

For this project, four cultures were selected. The productive process of drinking yoghurt was carried out on a pilot scale, using two cooling temperatures (24°C and 10°C) and two storage temperatures (25°C and 10°C), thus obtaining 4 final products for each type of culture. The following parameters were studied: kinetics of acidification, number of viable lactic acid bacteria, post acidification and rheometry during the useful life of the product. Both the production process and the monitoring of the yoghurt were carried out in triplicate and statistical software for the processing of the data (InfoStat) was used.

The cultures used, maintaining identical base and production parameters, had a significant impact on all parameters analyzed ($p < 0.05$), except for the count of *St. salivarius ssp. thermophilus*.

Besides, it was demonstrated how the change of certain process' parameters impacts in the final product. The cooling temperature did not affect post acidification or rheometry, while the storage temperature had a significant influence on post acidification ($p < 0.05$).

Key words: drinking yoghurt, cultures, post acidification, rheometry, lactic acid bacteria.

Índice

Resumen	3
Abstract	4
1. Introducción	8
1.1 Objetivos.....	8
1.2 Yogur bebible	9
1.3 Proceso productivo	17
1.3.1 Estandarización de proteína y materia grasa	17
1.3.2 Homogeneización	19
1.3.3 Pasteurización	21
1.3.4 Fermentación	30
1.3.4.1 Bioquímica de la fermentación.....	30
1.3.4.2 Cultivos lácticos	37
1.3.5 Enfriamiento y almacenamiento.....	42
1.3.6 Envasado.....	43
1.4 Seguimiento	43
1.4.1 Post-acidificación	44
1.4.2 Reometría.....	45
1.4.3 Recuento de bacterias ácido-lácticas	48
2. Hipótesis	51
3. Metodología	53
3.1 Estandarización de las proteínas y materia grasa de la base	54
3.1.1 Cálculo de los porcentajes de cada ingrediente de la base	55
3.2 Homogeneización	56
3.3 Pasteurización	58
3.4 Cultivos empleados y Fermentación	59
3.5 Pérdida de carga y Enfriamiento	62

3.6 Envasado.....	63
3.7 Seguimiento	64
3.7.1 Post-acidificación	64
3.7.2 Reometría.....	65
3.7.3 Recuento de <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i> y <i>Streptococcus salivarius subsp. thermophilus</i>	67
4. Resultados y Discusión	72
4.1 Cinética de acidificación	73
4.2 Post acidificación.....	76
4.3 Reometría.....	80
4.4 Recuento de <i>Streptococcus salivarius subsp. thermophilus</i> y <i>Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus</i>	83
5. Conclusiones.....	88
6. Bibliografía	91
7. Anexo.....	98
7.1 Anexo A: Análisis Estadístico.....	98
7.1.1 Supuestos ANOVA.....	98
7.1.1.1 Normalidad	98
7.1.1.2 Homocedasticidad	101
7.1.1.3 Muestras aleatorias y observaciones independientes	106
7.1.2 Resto del total de datos aportados por el programa al aplicar ANOVA de una vía en los Feature Points	107
7.2 Anexo B: Cronograma de las tres elaboraciones y sus respectivos seguimientos	109

INTRODUCCIÓN

1. Introducción

1.1 Objetivos

El objetivo general del presente Proyecto Final de Ingeniería (PFI) fue realizar un mapeo técnico de cultivos comerciales de bacterias lácteas aplicado a la producción de yogur bebible, bajo condiciones de procesos similares a las utilizadas en la industria láctea de Latinoamérica.

Para alcanzar dicho propósito, se plantearon dos objetivos específicos:

- Análisis del comportamiento de los distintos cultivos en el yogur bebible bajo idénticos parámetros de producción.
- Análisis del comportamiento de un mismo cultivo, bajo distintos parámetros de producción.

Particularmente, se estudiaron los siguientes parámetros de seguimiento:

- Cinética de acidificación.
- Post acidificación.
- Reometría.
- Números de bacterias viables responsables de la elaboración del yogur.

Para el desarrollo del PFI fuimos capacitados en el RAC LatAm (Centro de Aplicaciones Regional de Latinoamérica) de la empresa danesa líder mundial en insumos para productos lácteos Chr. Hansen, ubicada en el campus de Universidad Argentina de la Empresa (UADE), específicamente en la Planta Piloto de yogur, donde se llevó a cabo la totalidad del proyecto (Figura 1).



Figura 1. Ambas plantas pilotos de Chr. Hansen en el campus de UADE. Por el lado izquierdo puede observarse la planta de elaboración de yogur y, por el lado derecho, la planta de elaboración de queso.

1.2 Yogur bebible

El yogur es un producto lácteo obtenido a través de la fermentación láctica de la leche, gracias a la actividad de bacterias ácido lácticas (BAL) específica. Se asume que data del año 5000 a.C., con los Mesopotámicos quienes almacenaban la leche en recipientes hechos del estómago animal, el cual propiciaba la fermentación de la misma y su transformación a lo que actualmente se conoce como yogur (Enciso Martínez, 2016).

En esta zona la producción animal, junto con la producción de leche, era solo por temporadas y escasa. La leche era difícil de preservar debido a la contaminación por microorganismos del aire, animales y las manos de los lecheros (Nushrat Hossain, 2015).

Se cree, también, que el yogur era muy popular entre la gente nómada de la época medieval, los cuales idearon la producción como un proceso intuitivo para preservar la leche durante el viaje. El empaquetado también era un problema:

utilizaban la piel de los animales para contener el yogurt, salaban el producto y, por lo tanto, lo hacían más estable y con mayor conservación (Nushrat Hossain, 2015).

Durante la fermentación, calentaban la leche a fuego abierto para concentrarla ligeramente, modificar las propiedades de la caseína, erradicar cualquier microorganismo patógeno presente en la leche, estimular a que la fermentación de la leche tenga lugar a una temperatura ligeramente más alta y también para asegurar una selección gradual de bacterias ácido lácticas capaces de tolerar altos niveles de ácido láctico y de darle al producto su sabor distintivo. Métodos similares fueron utilizados por los turcos, armenios y egipcios, así como otras sociedades. Cada sociedad encontró los mejores métodos de preservación apropiados para sus necesidades, por ejemplo, salar y secar; calentar durante unas horas, a fuego bajo, en un tipo especial de madera llamado yogurt ahumado; o mantener el yogurt salado y seco en aceite de oliva o sebo. Otro método utilizado por los turcos, libaneses, sirios, iraníes e iraquíes fue mezclar yogurt concentrado con trigo que se llama kishk. Después de que la refrigeración se generalizó, estos métodos tradicionales perdieron popularidad, excepto entre ciertas comunidades en Medio Oriente (Nushrat Hossain, 2015).

Las leches fermentadas son productos preparados a partir de la leche entera, parcial o totalmente descremada, concentrada o bien sustituida total o parcialmente con leche descremada en polvo, pasteurizada o esterilizada y fermentada por medio de microorganismos específicos, siendo los principales las BAL.

Cuando estas fermentaciones son realizadas, se producen diversos metabolitos y muchos otros compuestos que conservan la leche y le imparten características organolépticas distintivas.

Existe una variedad muy amplia de leches fermentadas, en las que interviene un gran número de especies de BAL y algunas levaduras. Sin embargo, el yogurt es el más ampliamente difundido en el mundo. En algunos países el consumo de estos productos es superior al de leche fresca (Ramírez, 2011).

En la Figura 2, se puede visualizar el consumo de leche fermentada per cápita en función del PBI (GDP por su sigla en Inglés) per cápita de diferentes países del mundo en 2012, observándose que Chile, Uruguay y Argentina son los mayores consumidores per cápita de la región, mientras que Irán, Países Bajos, Suiza, Suecia y Arabia Saudita son los mayores consumidores a nivel mundial.

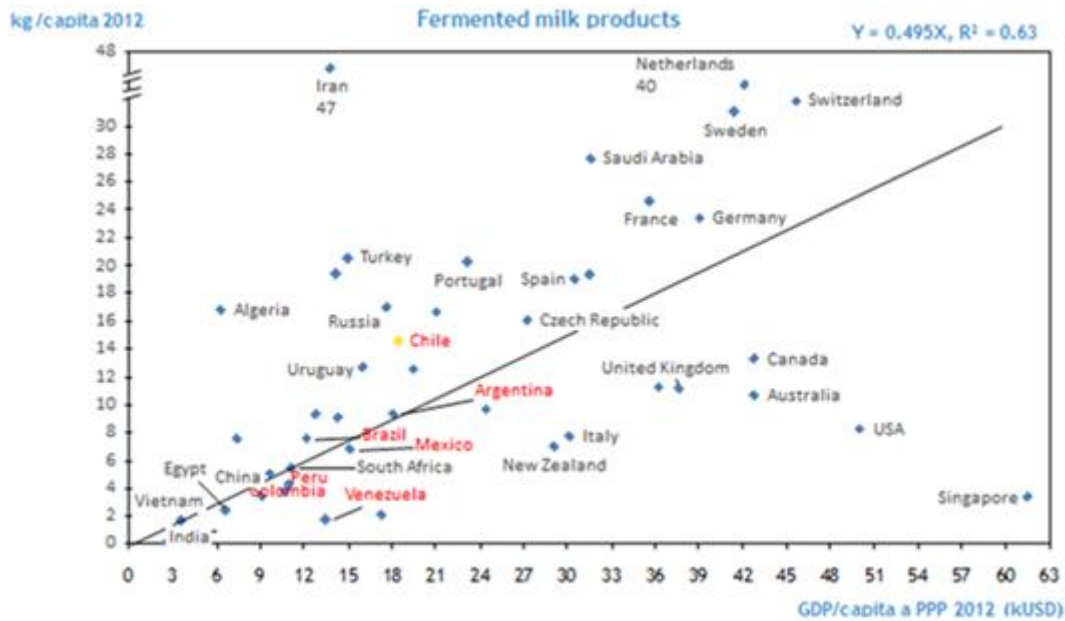


Figura 2. Consumo de leche fermentada per cápita en función del PBI (GDP por su sigla en inglés) per cápita de diferentes países del mundo. Fuente: Euromonitor Agosto 2013.

Dentro de las bebidas fermentadas, el yogur es una de las más consumidas en el mundo, tanto por sus propiedades nutricionales y funcionales, como por sus características sensoriales. Los productores de yogur buscan obtener la mejor calidad final del producto con el objetivo de satisfacer las necesidades del consumidor y obtener un posicionamiento en el mercado (Ruales Guzman, 2010).

En los últimos años, los yogures bebibles se han vuelto cada vez más populares presentando un consumo creciente en todo el mundo. *Se espera que el mercado global de yogur bebible crezca a una tasa del 8 % cada año* (Weler, 2016).

La cantidad de yogur bebible vendido a nivel mundial en el año 2016 fue de 14.274.000 toneladas (Euromonitor, 2017). Para el caso de Latinoamérica, la cantidad

de yogur bebible vendido a nivel mundial en el año 2016 fue de 1.680.000 toneladas (Euromonitor, 2017).

Los consumidores en América Latina gastan menos de la mitad que sus contrapartes, en Europa Occidental o América del Norte, en productos lácteos. Si bien la leche y el queso forman parte de la dieta de América Latina, en la mayoría de los países, en particular en las zonas rurales, los productos lácteos se consumen en formato no envasado. Esto presenta tanto desafíos como oportunidades para la industria, en particular en categorías de alto crecimiento como el queso y el yogur para beber (Euromonitor International, 2017).

En la Figura 3 puede observarse que el yogur bebible es el producto lácteo que más creció en el período 2011-2016 en Latinoamérica, principalmente en Brasil, Argentina y Perú (Euromonitor International, 2017).

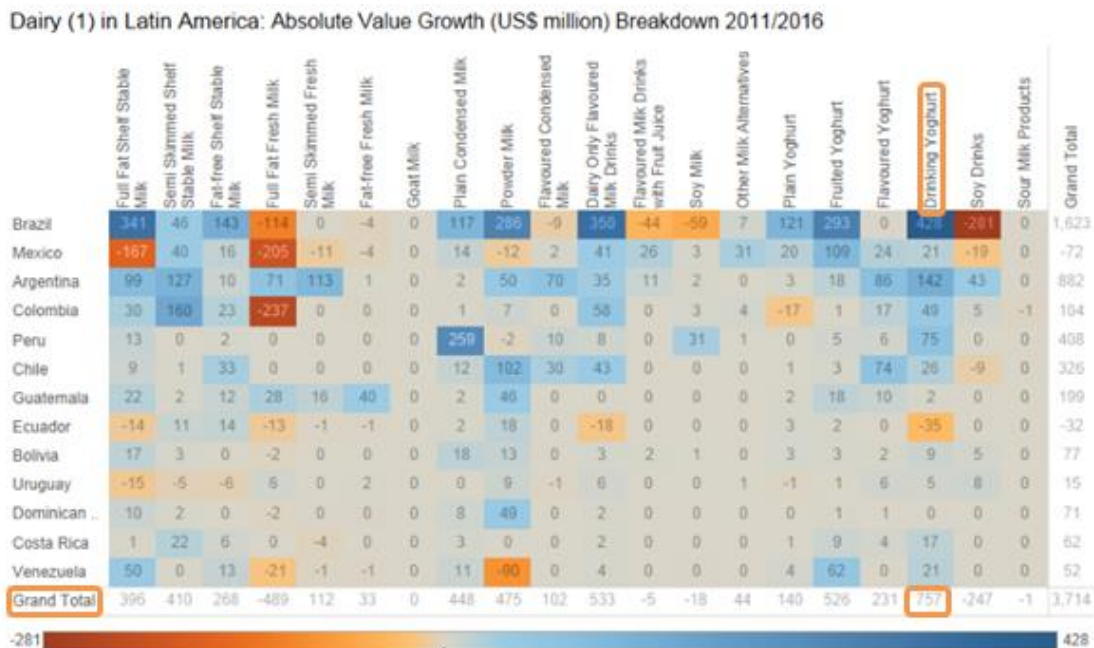


Figura 3. Crecimiento del valor absoluto (US\$ millones) de distintos productos lácteos en Latinoamérica (2011-2016).

Los consumidores en toda América Latina están reemplazando cada vez más a la leche por yogur, al que perciben como una adición saludable a su dieta: es naturalmente saludable pero aún indulgente. En particular, el yogur con sabor a fruta y el yogur bebible emergieron como los mayores protagonistas en 2011-2016, lo que también se refleja en la creciente actividad de fusiones y adquisiciones en la región.

En Perú el yogur es otra categoría de rápido crecimiento, estimando que crezca un 6.4% de CAGR (Compound Annual Growth Rate) (Euromonitor International, 2017).

En México, el yogurt continuará impulsando el crecimiento en los productos lácteos, consumiéndose de varias maneras: comúnmente durante el desayuno, a menudo como aderezo de fruta fresca o incluido en batidos. También se lo considera una opción conveniente y saludable para las viandas de almuerzo de los niños o como un aperitivo para los trabajadores de oficina (Euromonitor International, 2017).

En lo que respecta a Argentina, en la Tabla I puede observarse la evolución del consumo anual de yogur, desde el año 2000 hasta el 2016.

Tabla I: Consumo de yogur anual total y per cápita, en Argentina desde el año 2000.

Fuente: Subsecretaría de Lechería - Ministerio de Agroindustria.

Argentina (Yogur)	2000	2003	2005	2008	2010	2013	2016
Consumo anual total [Toneladas]	250.349	278.135	402.696	519.475	483.393	484.552	440.362
Consumo anual per cápita [kilos]	6,72	7,37	10,48	13,13	11,98	11,79	9,75

En el año 2008 se produce el pico de consumo de yogur anual, para luego descender hasta un valor de 9,75 Kg per cápita anuales en el 2016. Este descenso es debido, probablemente, a la crisis económica que existe actualmente en la industria láctea y a la caída del poder adquisitivo de los consumidores.

En el caso particular del yogur bebible, independientemente de la crisis, puede observarse en la Tabla II que tendió a aumentar la cantidad consumida, siendo el producto más destacado dentro del segmento de yogur.

Tabla II: Consumo anual total de yogur bebible en los últimos años.

Fuente: Euromonitor from trade sources/national statistics.

Argentina (Bebible)	2012	2013	2014	2015	2016
Consumo anual total [000 Toneladas]	215	214	216	216	229

La tendencia con respecto al yogur bebible en Argentina para los próximos años indica un aumento, alcanzando casi las 260.000 toneladas anuales para el año 2022 (Tabla III).

Tabla III: Tendencia sobre el consumo anual de yogur bebible para los próximos años.

Fuente: Euromonitor from trade sources/national statistics.

Argentina (Bebible)	2018	2019	2020	2021	2022
Consumo anual total [000 Toneladas]	228	234	241	250	259

La aceptación del yogur por parte del consumidor depende de la acidez, la percepción del aroma y de la textura (Beal *et al*, 1999).

No hace mucho tiempo atrás, el yogur se limitaba a considerarse como un producto fermentado que se vendía principalmente en tiendas de productos dietéticos. Las técnicas de elaboración eran muy básicas, la producción era escasa y los productos obtenidos presentaban características y calidad muy variables. *El yogur sobrevivió a los cambios que introdujeron las grandes migraciones, así como a revoluciones tecnológicas y culturales, y se extendió por todo el globo. En la actualidad constituye uno de los alimentos de más rápida expansión en la Argentina y en el mundo* (Weill, 2017). El gran aumento de la demanda de este producto en los últimos tiempos ha conducido a que los estudiantes y el personal de las industrias lácteas precisen un conocimiento mucho más amplio de los procesos bioquímicos y de los distintos sistemas de producción, calidad y características nutritivas del producto (Crawford, 1991). En Argentina, la producción de yogur fue de 450 millones de kg promedio anuales, considerando los últimos 5 años (Subsecretaría de Lechería de Argentina, 2017).

La forma tradicional de elaboración del yogur y de muchas leches fermentadas era mediante el crecimiento espontáneo de microorganismos indígenas presentes en la leche. Actualmente su producción se basa en procesos microbianos cuidadosamente controlados, utilizando combinaciones seleccionadas de cultivos, y la tecnología requerida para la producción a gran escala ha evolucionado a partir del conocimiento

*de la fisiología y la bioquímica de los microorganismos involucrados. La leche es un medio rico que sustenta el crecimiento de muchos microorganismos, y el procesamiento de la leche provee control sobre el tipo de crecimiento necesario para lograr el producto deseado. La fermentación de la leche generalmente es conducida por las bacterias ácido lácticas termófilas **Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus** y **Streptococcus salivarius ssp. thermophilus**. Desde fines de los '70 mucho se ha avanzado con respecto a la bioquímica y biología molecular de **S. thermophilus** y **L. delbrueckii ssp. bulgaricus** (Taboada, 2014).*

La leche y el yogur son elementos importantes de la dieta humana, debido a su alto valor nutricional y sus atractivas propiedades organolépticas. Durante el procesamiento de la leche (homogeneización, pasteurización) y la fabricación adicional del yogur (fermentación) ocurren cambios fisicoquímicos que afectan el sabor y la textura de estos productos. La implementación de procesos estandarizados contribuye al desarrollo de las características deseables de textura y sabor. Los procesos que tienen lugar durante el procesamiento de leche y la fabricación de yogur son métodos industriales convencionales (Sfakianakis y Tzia, 2014).

La naturaleza imprevisible de la fermentación hace que continuamente se siga investigando sobre el tema con el objetivo de solucionar las dificultades que surgen en este proceso biológico natural, para poder crear procesos productivos y distribución del producto cada vez más eficientes (Tamime y Robinson, 1991).

Los yogures se pueden diferenciar según diversos factores: formulación de la base (tenor de grasa, de proteínas, estabilizantes, espesantes, azúcares, edulcorantes), selección del cultivo, parámetros de proceso (temperatura de fermentación, pH de corte, temperatura de enfriamiento, tratamiento mecánico, etc), agregado de pulpa de fruta o saborizantes, ingredientes funcionales (probióticos, prebióticos, etc) (Alem, 2015).

En la Figura 4 se pueden apreciar los factores más importantes relacionados a los productos lácteos fermentados, los cuales se profundizarán en la sección 1.3 y 1.4.

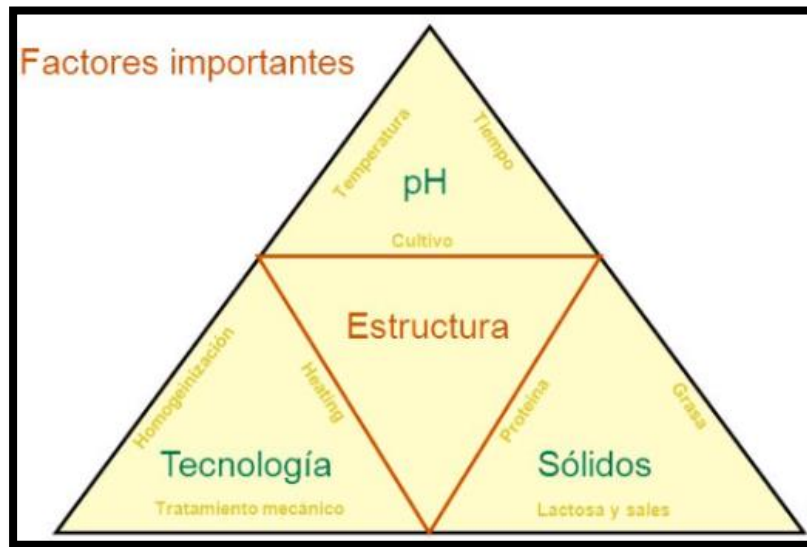


Figura 4. Factores que afectan la estructura de los productos lácteos fermentados. Fuente: Alem, 2015.

El tema estudiado en este proyecto es de gran relevancia debido a que permite observar el impacto de los distintos tipos de cultivos en el yogur bebible, lo cual facilitará a los fabricantes del producto la elección del cultivo en función de las características de su proceso, evitándoles realizar numerosas pruebas para lograr el resultado buscado. A su vez, permite al vendedor del cultivo otorgar una información más exacta acerca de la funcionalidad de los distintos cultivos bajo diferentes parámetros del proceso.

Para unificar criterios, tomaremos las definiciones de leche fermentada y de yogur que se encuentran presentes en el Codex Alimentarius, el cual es representativo de la mayor parte de la región de Latinoamérica.

La leche fermentada es un producto lácteo obtenido por medio de la fermentación de la leche, que puede haber sido elaborado a partir de productos obtenidos de la leche con o sin modificaciones en la composición [...], por medio de la acción de microorganismos adecuados y teniendo como resultado la reducción del pH con o sin coagulación (precipitación isoeléctrica). Estos cultivos de microorganismos serán viables, activos y abundantes en el producto hasta la fecha de duración mínima. Si el producto es tratado térmicamente luego de la fermentación, no se aplica el requisito de microorganismos viables.

Ciertas leches fermentadas se caracterizan por un cultivo específico (o cultivos específicos) utilizado para la fermentación del siguiente modo:

*Yogur: Cultivos simbióticos de **Streptococcus thermophilus** y **Lactobacillus delbrueckii subesp. bulgaricus** [...].*

Podrán agregarse otros microorganismos aparte de los que constituyen el cultivo específico (o los cultivos específicos) especificados anteriormente. (Codex Alimentarius, 2011).

Los microorganismos estárter del yogur son bacterias acidolácticas termófilas capaces de crecer a temperatura de 40-45 °C (Tamime y Robinson, 1991).

Existen cinco clasificaciones de yogur (Gösta Bylund, 1995) de las cuales bebible, batido y firme son las más utilizadas en la industria láctea.

Un yogur bebible es aquel incubado en tanques y enfriado, diferenciándose del batido en que se produce una rotura de su coágulo más enérgica, llevándolo a una consistencia líquida antes de ser envasado.

El yogur fluido puede considerarse como yogur batido de baja viscosidad (Dave, 1998).

1.3 Proceso productivo

1.3.1. Estandarización de proteína y materia grasa

El primer paso del proceso productivo de yogur es la estandarización de proteína y materia grasa de la base, junto con su formulación. Las legislaciones de los países establecen distintos límites de concentraciones obligatorios para estos compuestos bioquímicos. En el caso de las proteínas lácteas, el Código Alimentario Argentino (C.A.A.) establece un mínimo de 2,9 g/100 g, y para el caso de la materia grasa láctea establece distintas concentraciones según el tipo de yogur, a saber: con crema (mínimo 6,0 g/100 g), enteros (3,0 a 5,9 g/100 g), parcialmente descremados (0,6 a 2,9 g/100 g) y descremados (máximo 0,5 g/100 g). Para lograr la concentración deseada en el yogur, se combinan los ingredientes: leche, crema y agua. La leche es la principal fuente de proteínas lácteas, mientras que la materia grasa es principalmente aportada por la crema. El agua se utiliza para compensar la cantidad de materia faltante y para

bajar la concentración proteica. Posteriormente serán explicados los cálculos para obtener la cantidad exacta de ingredientes de la base.

Es importante conocer tanto el contenido de proteínas como de materia grasa de la leche utilizada en la formulación del yogur ya que son los que repercutirán en la cinética de acidificación y en el producto final. La proteína repercute en la velocidad de acidificación durante la fermentación. En la Figura 5 se estudiaron bases con distintos porcentajes de proteínas en un mismo cultivo de Chr. Hansen a una temperatura determinada (43°C), resultando que aquellas bases con menor contenido de proteínas fueron las que acidificaron más rápidamente.

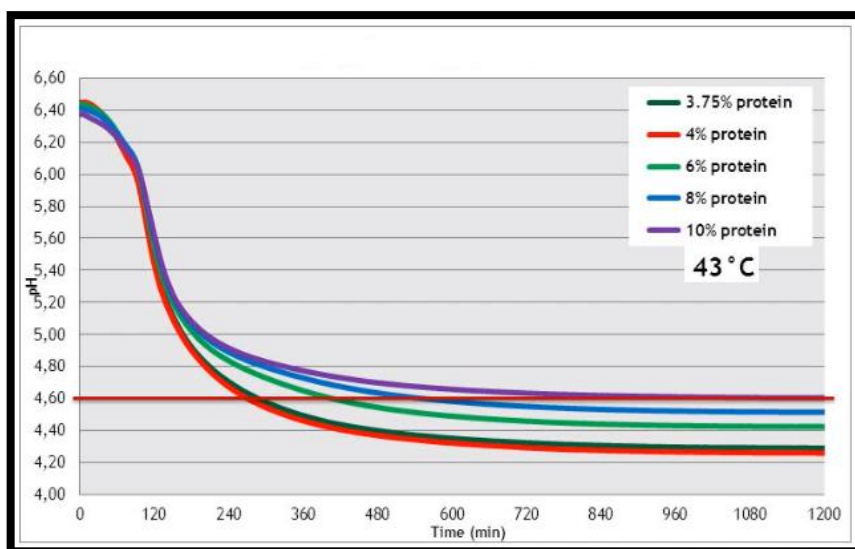


Figura 5. Efecto de la concentración proteica sobre el tiempo de acidificación a 43°C.

El resto de la base suele estar formada por estabilizantes/emulsionantes, azúcares y/o agentes edulcorantes. Existen otros ingredientes en los cuales no se profundizará ya que no formarán parte de la formulación de nuestros prototipos.

Los estabilizantes/emulsionantes están regulados, tanto en tipo como en concentración, por la legislación de los países. Entre los más utilizados se encuentran: gelatina, almidón: nativos y modificados, pectinas, goma arábica, goma guar, carragenatos, alginatos. El Codex Alimentarius establece el uso de gelatina y almidón en leches fermentadas simples si lo permite la legislación nacional del país de venta al consumidor final. El C.A.A. establece un máximo de 10g de gelatina/ kg de producto

final y 1% m/m del producto final de almidón o almidón modificado.

En algunos países de Latinoamérica, como por ejemplo Colombia, la utilización de estos estabilizantes cambia la denominación del producto.

Los estabilizantes mejoran y mantienen la textura, viscosidad, cuerpo, y aspecto del yogur. Puntualmente retienen agua y favorecen el aumento de la viscosidad.

La finalidad principal de los azúcares y agentes edulcorantes es atenuar la percepción de acidez en boca. La concentración de azúcar en el producto final va a depender en gran medida del perfil del producto, del gusto promedio del consumidor, los posibles efectos inhibidores sobre los microorganismos estárter del yogur, limitaciones legales y consideraciones económicas (Tamime y Robinson, 1991).

La concentración de azúcar de la base, al igual que la proteína, tiene impacto en la velocidad de acidificación. Cuanto mayor es la concentración, mayor es el tiempo de fermentación (Figura 6).

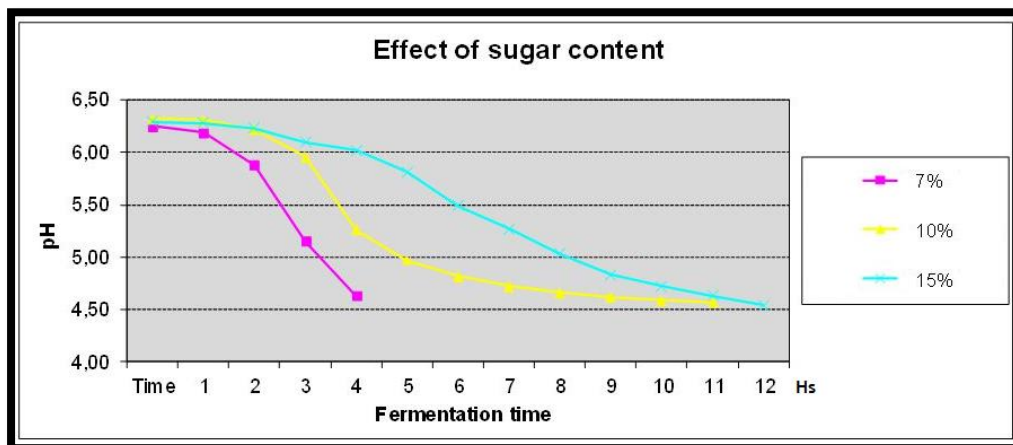


Figura 6. Curvas de acidificación de bases con distinta concentración de azúcar, fermentadas a partir de un mismo cultivo de Chr. Hansen. Fuente: Alem, 2015.

1.3.2. Homogeneización

La leche es una emulsión típica de aceite en agua (o / w), con glóbulos grasos que actúan como las gotitas de aceite y sus membranas como emulsionantes. Sin embargo, debido a la reacción de las aglutininas (inmunoglobulinas) y la tensión interfacial, los glóbulos grasos tienden a colisionar, ya sea al compartir la membrana o por el principio de Laplace, según el cual la presión es mayor dentro de glóbulos

pequeños que dentro de glóbulos grandes y, por lo tanto, es una tendencia a que los grandes glóbulos grasos crezcan a expensas de los más pequeños. Este fenómeno, sumado al movimiento browniano, fuerza a la grasa láctea a subir a la superficie de la leche y crea así el efecto indeseable de la separación. (Sfakianakis y Tzia, 2014).

Para prevenir este efecto, la leche estandarizada se homogeniza. El principio básico de la homogeneización de la leche es someter a los glóbulos grasos a condiciones severas para romper la membrana que lo rodea y luego mantener los nuevos glóbulos en dispersión mientras se forma una nueva membrana en la interfaz suero-grasa. Las condiciones severas que causan la homogeneización de la leche se pueden lograr mediante la aplicación de presión, flujo de alta velocidad de la leche o vibraciones de alta frecuencia (> 10 kHz). (Sfakianakis y Tzia, 2014).

La aplicación de presión, que es el método que se utilizará, consiste en hacer pasar la base a través de un pequeño orificio a elevada presión, reduciendo el tamaño de los glóbulos grasos, logrando así la formación de una emulsión de aceite en agua más “fina” (o más estable o más particulada) que la original. Esta etapa es importante ya que impide que la grasa se separe, formando una capa superficial en los tanques de fermentación. La reducción del tamaño de los glóbulos grasos aumenta la adsorción de los mismos sobre las micelas de caseína, generando un aumento de las sustancias en suspensión, lo cual aumenta la viscosidad del producto. La membrana de los glóbulos absorbe las moléculas de proteína, en su mayoría caseínas, del suero de la leche. Esto es suficiente para emulsionar los glóbulos recién formados, ya que el área de la superficie grasa aumenta debido a la homogeneización (Sfakianakis y Tzia, 2014). Los glóbulos grasos más pequeños facilitan la incorporación de grasa en la red de proteínas, mientras que el aumento de superficie favorece las interacciones entre proteínas, grasas y leche, durante la acidificación y la posterior formación de gel (Cho *et al.*, 1999).

Por otra parte, el aumento de la cantidad de glóbulos grasos otorga un color más blanco al yogur. Otro efecto importante de la homogeneización es la disminución de la sinéresis (separación de las fases que componen una suspensión o mezcla), a causa del aumento de la hidrofobicidad y capacidad de retención de agua de las caseínas que forman parte de la membrana del glóbulo graso y a otras interacciones proteína-proteína. Este último efecto, también favorece el aumento de la viscosidad.

1.3.3. Pasteurización

El tercer paso es el tratamiento térmico o pasteurización de la base, el cual permite eliminar microorganismos patógenos (forma vegetativa) y otros microorganismos indeseables garantizándole, de esta forma, al cultivo estárter un sustrato libre de microorganismos competidores. También permite realizar otras modificaciones en la leche que mejorarán el producto final, las cuales serán descriptas a continuación.

Un tratamiento térmico más intenso es la pasteurización a alta temperatura, que requiere una temperatura de 85 °C, durante 20-30 minutos o 90-95 °C, durante 5 minutos.

Durante la pasteurización a alta temperatura, la mayoría de los microorganismos vegetativos mueren, mientras que las esporas sobreviven. Gran parte de las enzimas están desactivadas (excepto las proteinasas de la leche [la plasmina en particular], algunas proteinasas y lipasas bacterianas).

La leche procesada a 82°C-15 min. o 65°C-30 min. tiene una firmeza de gel considerablemente más alta que aquella tratada con UAT (Ultra Alta Temperatura) (149°C; 0-12 seg.). En otros estudios se demostró que el yogur realizado con leche UAT mostró una menor firmeza de gel y viscosidad aparente en comparación con el yogur realizado a partir de leche tratada a 82°C- 30 min. Por lo general, los métodos UAT o HTST (High Temperature Short Time) otorgan baja firmeza y una calidad pobre de textura comparado con los métodos convencionales (Yildiz, 2010).

Las estructuras secundarias y terciarias de las proteínas de suero tienden a descomponerse por tratamiento térmico porque los enlaces hidrofóbicos y de puente de hidrógeno se debilitan por el calentamiento. La reactividad de los grupos tiol (-SH), que están principalmente presentes en la β -lactoglobulina (principal proteína de suero), aumentan mediante el tratamiento térmico.

Las proteínas de suero de la leche, que contienen cisteína y cistina, pueden sufrir reacciones de oxidación de sulfhidrilo y / o disulfuro de intercambio, que conducen a la formación de agregados (Yildiz, 2010).

La caseína, proteína más importante, no es considerada desnaturizable por calor en condiciones normales de pH, sal y contenido de proteína. En cambio, las proteínas de suero, particularmente la β -lactoglobulina, la cual forma más del 50% del total de proteína de suero, son largamente sensibles al calor (Figura 7) (Gösta Bylund, 1995).

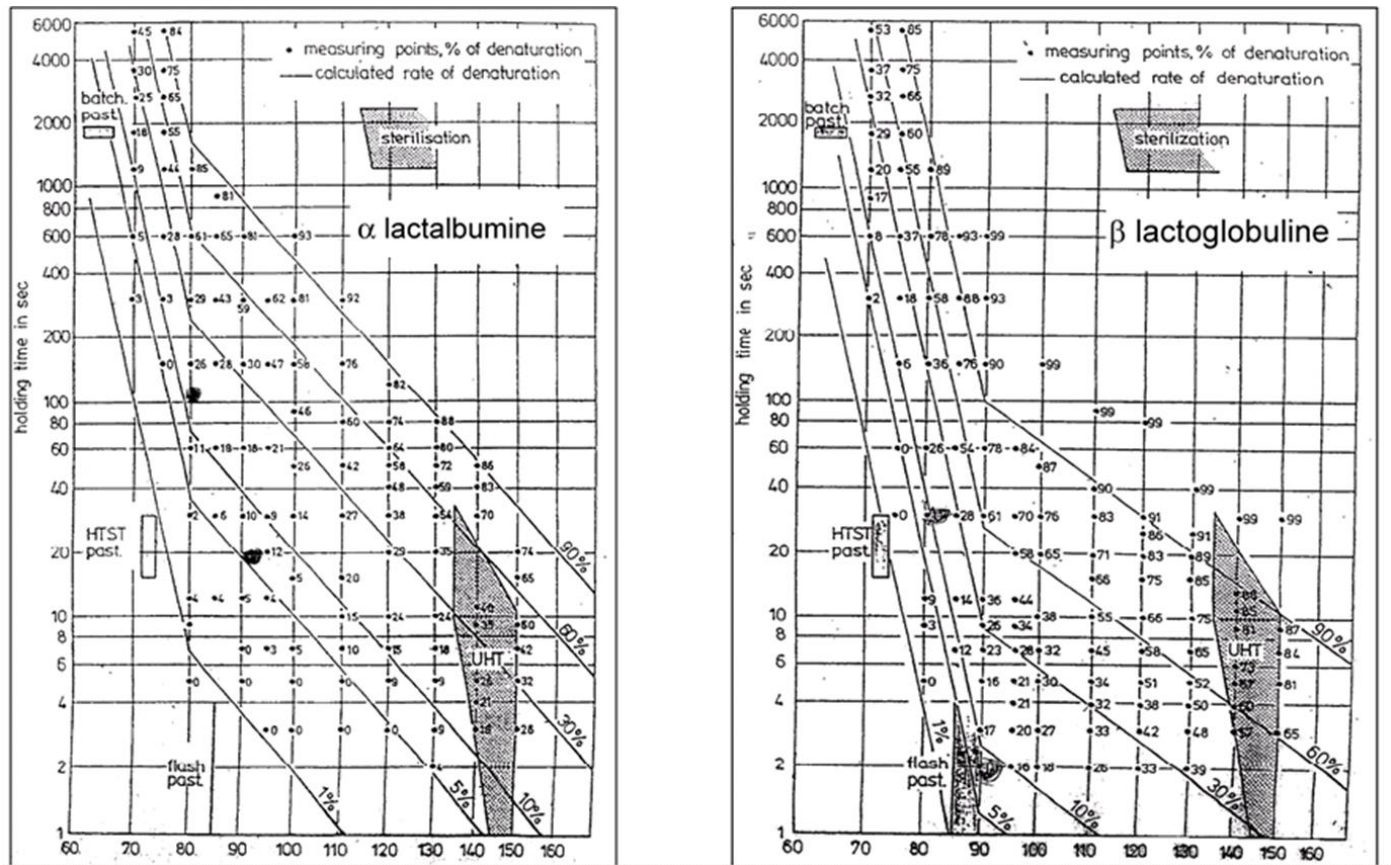


Figura 7. Distintas combinaciones de temperatura y tiempo de pasteurización para obtener diferentes porcentajes de proteína de suero desnaturizada, específicamente α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina.

La desnaturalización comienza a los 65°C y es casi total cuando las proteínas de suero son calentadas a 90°C durante 5 minutos. La desnaturalización por calor de la proteína de suero es irreversible. Estas proteínas desnaturizadas, en particular la β -lactoglobulina, están unidas a la κ -caseína por puentes disulfuro (Figura 8) (Gösta Bylund, 1995).

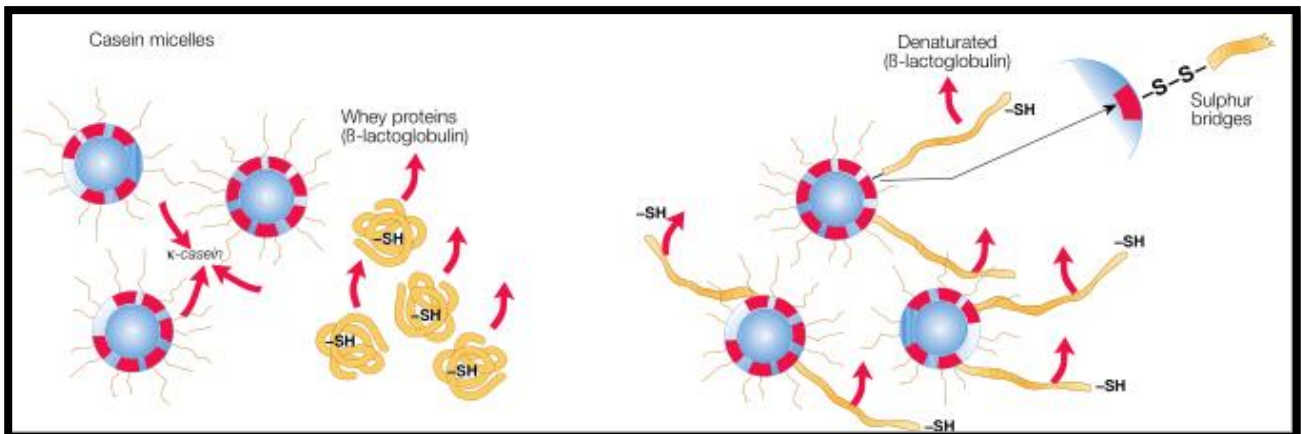


Figura 8. Durante la desnaturalización, la κ -caseína se adhiere a la β -lactoglobulina. Fuente: Gösta Bylund, 1995.

La mayoría de las proteínas de suero se desnaturalizan, y se desarrolla un sabor a "cocido" debido a la formación, en su mayoría, de cetonas. No ocurren otros cambios irreversibles (Sfakianakis y Tzia, 2014).

El tratamiento térmico ordinario permite la eliminación de algunos sabores no deseables, pero determinados tratamientos pueden ser así mismo origen de sabores anómalos, por ejemplo sabor caramelo, como resultado de reacciones de Maillard entre la lactosa y los grupos amino de las proteínas (Tamime y Robinson, 1991).

Según Scaramal (2010), las condiciones más apropiadas para un tratamiento térmico son 90-95 °C, durante alrededor de 5 minutos en sistemas de flujo continuo. Estos parámetros contribuyen a mejorar la calidad, reduciendo la sinéresis y mejorando la calidad (Gösta Bylund, 1995). Como se aclaró anteriormente, si bien no se destruyen completamente todas las enzimas de la leche, aquellas que mantienen su actividad no generan inconvenientes para las leches fermentadas. Se reduce la cantidad de oxígeno disuelto, generando condiciones de microaerofilia favorables para el cultivo estárter.

Las proteínas de suero, al desnaturalizarse parcialmente, reaccionan con la caseína formando micelas más estables, lo cual va a favorecer el aumento de la velocidad de formación del gel junto con su viscosidad. También se liberan compuestos nitrogenados que pueden estimular el desarrollo de los microorganismos estárter.

Según Tamime y Robinson (1991), la leche sometida a calentamiento forma geles con una distribución continua de la proteína en toda la masa del yogur, quedando

la fracción acuosa retenida en la red formada. El coágulo formado es firme y menos susceptible a la sinéresis. Por el contrario, las micelas de caseína no tratadas con calor forman agregados en donde la proteína está distribuida de modo heterogéneo, lo cual empeora la inmovilización del agua haciendo el coágulo más débil, aproximadamente un 50% en comparación con el anterior. En la Figura 9 puede observarse que la resistencia del coágulo a la penetración crece al aumentar el porcentaje de desnaturalización de la proteína de suero alcanzando la máxima resistencia al 99% de desnaturalización.

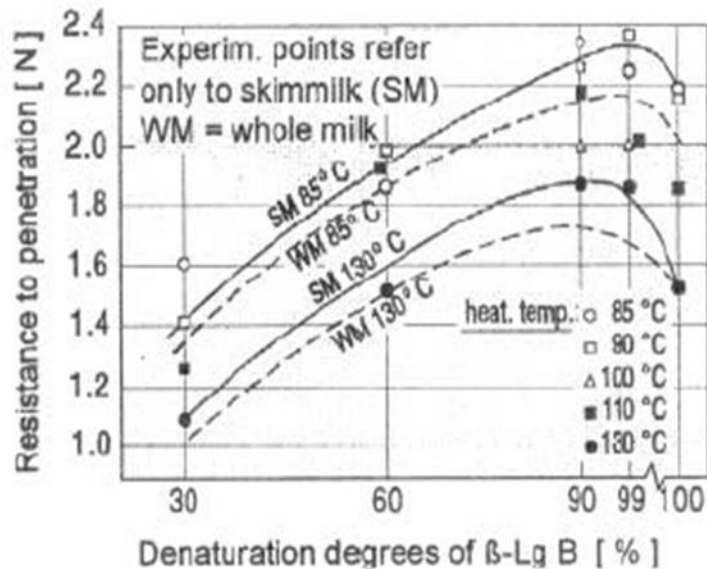


Figura 9. Resistencia a la penetración del coágulo en función del porcentaje de β-lactoglobulina desnaturalizada. Se estudió en leche entera y descremada tratadas a dos temperaturas: 85°C y 130°C. Fuente: Kessler, 1997.

La sinéresis, en cambio, se reduce al aumentar el porcentaje de proteína de suero desnaturalizada, siendo menos pronunciada esta tendencia luego del 90% (Figura 10).

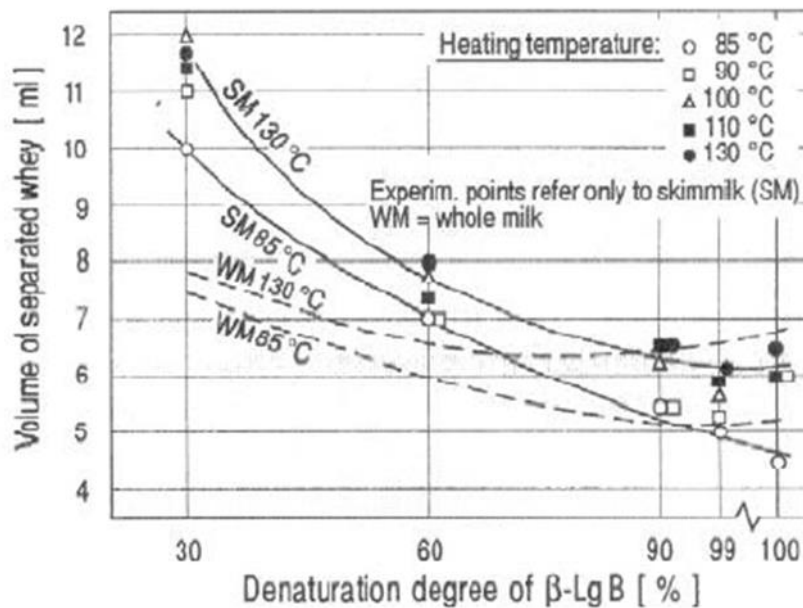


Figura 10. Volumen de suero liberado en función del porcentaje de desnaturalización de β -lactoglobulina. Se estudió en leche entera y descremada tratadas a dos temperaturas: 85°C y 130°C. Fuente: Kessler, 1997.

Se puede apreciar en la Figura 11 una buena descripción gráfica de lo que ocurre en la microestructura del yogur ante la combinación de la homogenización junto al tratamiento térmico, observándose el efecto que causa la ausencia de uno o de ambas etapas.

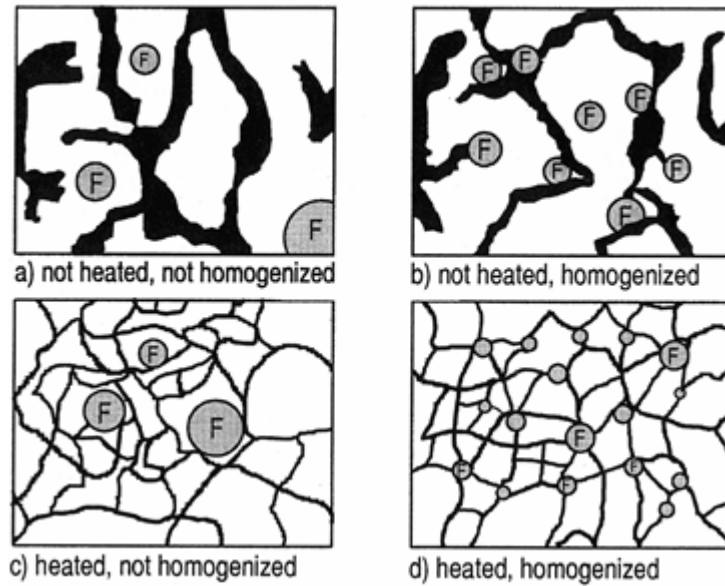


Figura 11. Diagrama esquemático del efecto del tratamiento térmico y la homogenización sobre la microestructura del gel del yogur entero (“F”: glóbulos de grasa). Fuente: Kessler, 1997.

En la Figura 12 puede observarse la influencia tanto de la homogenización como de la pasteurización sobre la viscosidad en el producto final. La viscosidad aumenta cuando la base es homogeneizada y aún más cuando la temperatura de pasteurización es mayor, debido a que la firmeza del gel aumenta.

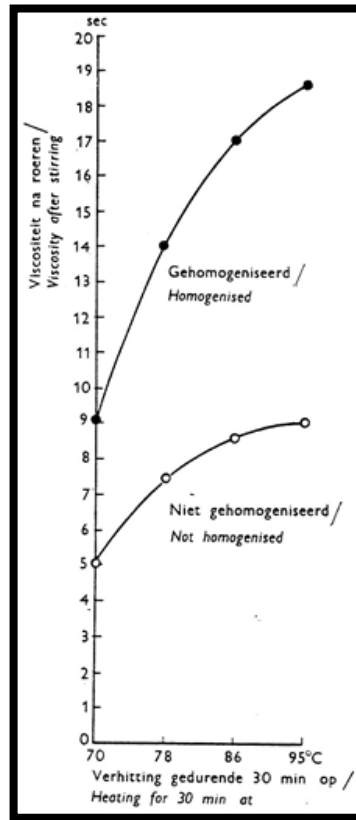


Figura 12. Influencia de la homogenización y de los diferentes tratamientos térmicos en la viscosidad del yogur. (Homogenización a 20 MPa y 55 °C). Fuente: Galesloot, 1958.

Existe una relación entre la composición de la base (contenido de grasa), la homogenización y el tratamiento térmico aplicado sobre la viscosidad del yogur. La viscosidad incrementa con el aumento de la cantidad de grasa utilizada, siempre y cuando la misma sea homogeneizada. Este aumento es mayor cuando la base es tratada térmicamente (Figura 13).

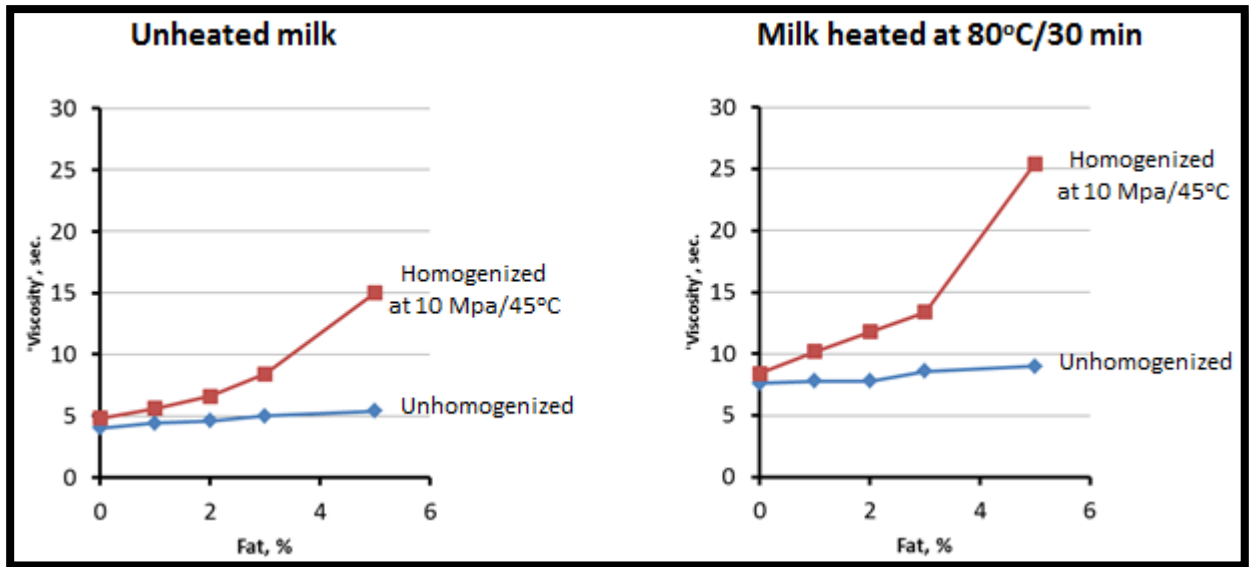


Figura 13. Relación entre el contenido de grasa, la homogenización y el tratamiento térmico aplicado sobre la viscosidad en el producto final (Homogenización a 10 MPa y 45 °C & tratamiento térmico a 80°C y 30 min). Fuente: Chr. Hansen.

La homogenización y el tratamiento térmico tienen influencia en la viscosidad del yogur. A medida que aumenta la presión de la homogenización y cuanto mayor es la relación tiempo-temperatura del tratamiento térmico aplicado, mayor es la viscosidad en el producto final (Figura 14).

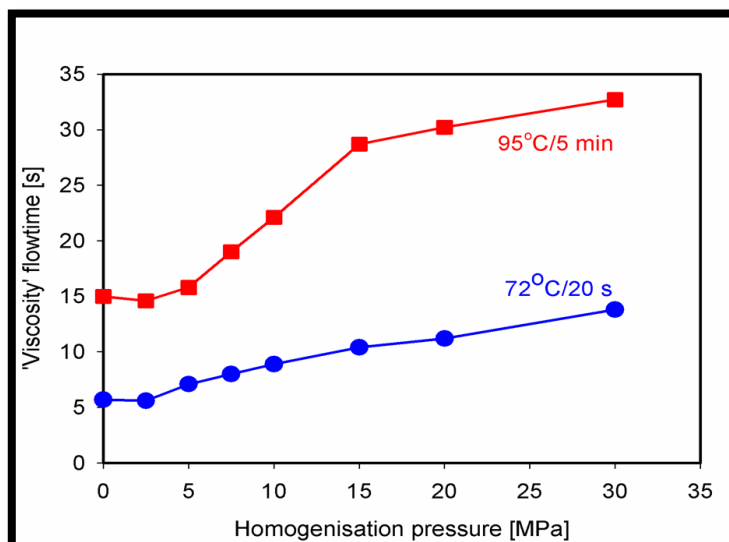


Figura 14. Influencia de la homogenización y el tratamiento térmico en la viscosidad del yogur. Se compara la viscosidad del yogur aplicando dos tratamientos térmicos distintos: 95 °C-5 min y 72°C-20 seg. Fuente: Gösta Bylund, 1995.

Para esta etapa el equipo que se utiliza es un pasteurizador. Su componente más importante es el intercambiador de calor de placas.

En las industrias de proceso, la transferencia de calor entre dos fluidos casi siempre se lleva a cabo en intercambiadores de calor. El tipo más común es aquel en el que el fluido caliente y el frío no entran en contacto directo el uno con el otro, sino que están separados por una pared de tubos o una superficie plana o curva. La transferencia de calor se efectúa por convección desde el fluido caliente a la pared o la superficie de los tubos, a través de la pared de tubos o placa por conducción, y luego por convección al fluido frío (Geankoplis, 1998).

Los que más se destacan en la industria láctea son: intercambiadores de calor de placas, intercambiadores de calor de tubos, e intercambiadores de calor de superficie rascada (éste suele utilizarse para aquellos preparados con frutas). Actúan en un modo continuo, lo que presenta algunas ventajas con respecto a los sistemas de intercambio de calor discontinuos: ocupan menor espacio y requieren menos energía ya que es más eficaz la transferencia de calor.

El intercambiador de placas consiste básicamente en una serie de placas corrugadas de acero inoxidable que son mantenidas juntas, a través de largos tornillos, en un armazón. En los bordes posee juntas de goma que evitan cualquier tipo de fuga o mezcla entre el medio calefactor/refrigerador y la base que está siendo enfriada/calentada.

Según Tamime y Robinson (1991), para el calentamiento de la base son aconsejables placas muy juntas, mientras que para el enfriamiento del yogur es preciso utilizar una mayor separación. Lo primero se debe a que la leche fluye formando una fina lámina a lo ancho de la placa, permitiendo un rápido intercambio de calor, pero para el enfriamiento de yogur ya coagulado, se necesita una mayor separación entre las placas para evitar una disminución excesiva de la viscosidad del producto.

Las industrias suelen utilizar intercambiadores de calor leche-leche, en el cual la leche pasteurizada intercambia calor con la leche cruda. Esto tiene la ventaja de permitir un ahorro de energía y por lo tanto un abaratamiento de los costos, pero la desventaja reside en que no se puede lograr setear una temperatura exacta de pasteurización. Por estas razones, la planta piloto cuenta con intercambiadores de calor agua-leche ya que se desea poder setear una temperatura de pasteurización más exacta

y, como es escala reducida, el gasto energético no es alto, comparado con el de una planta industrial.

1.3.4. Fermentación

El cuarto paso es el proceso de fermentación, etapa determinante en la producción de yogur debido a que es donde se inocula e incuba el cultivo de bacterias acidolácticas. *El factor clave del proceso de fermentación es el cultivo inicial que actúa a través de reacciones bioquímicas e inductivamente causa la formación del coágulo y el desarrollo de componentes de sabor* (Sfakianakis y Tzia, 2014).

El fenómeno de la acidificación es un proceso bioquímico caracterizado por su complejidad e incluye diversas reacciones en las cuales el cultivo de fermentación produce ácido láctico y compuestos aromáticos y volátiles, que dan al yogur sus características particulares (Madeiros *et al*, 2015).

1.3.4.1. Bioquímica de la fermentación

La fermentación láctica es una ruta metabólica anaeróbica que ocurre en el citosol de la célula, en la cual se oxida parcialmente la glucosa para obtener energía y donde el producto de desecho es el ácido láctico

Las bacterias obtienen energía principalmente de la lactosa (disacárido formado por la unión de glucosa y galactosa) la cual metabolizan (fermentan) dando lugar al ácido láctico y otros compuestos.

Por cada molécula de glucosa que se oxida mediante glucólisis, dos moléculas de NAD^+ son reducidas a NADH , y se obtienen dos piruvatos y dos moléculas de ATP (Figura 15). En los organismos aeróbicos facultativos fermentadores, cuando existe la imposibilidad de utilizar el poder reductor generado en forma de NADH en la cadena transportadora de electrones, se recurre a la reducción de un sustrato endógeno (esto es, un producto del propio metabolismo), como forma de reciclar el NADH en NAD para permitir que la glucólisis continúe y se siga generando ATP.

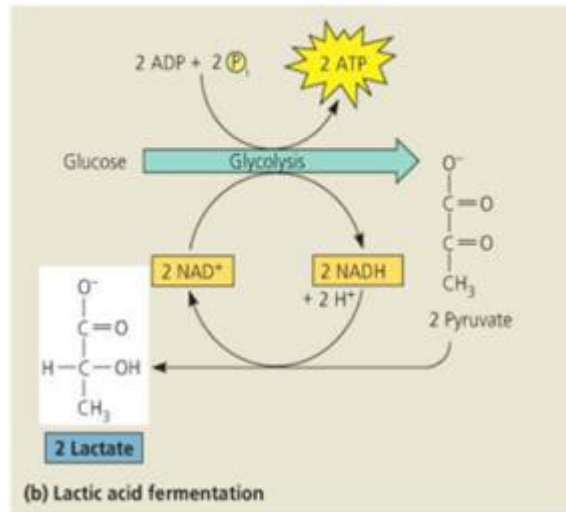
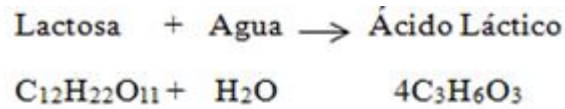


Figura 15. Ruta metabólica de la fermentación láctica.

Fuente: Campbell *et al.*, 2014.

En la fermentación láctica, el sustrato endógeno utilizado es el propio piruvato, producto de la glucólisis, que se reduce a ácido láctico (Figura 15). El ácido láctico, dado que otorga acidez al medio, tiene excelentes propiedades conservantes de los alimentos.

Las bacterias acidolácticas poseen una enzima llamada lactasa, cuyo nombre científico es β -galactosidasa, la cual hidroliza la lactosa en sus dos residuos: glucosa y galactosa. Debemos saber que sobre todo la glucosa es la utilizada por estas bacterias. El *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* va a transformar la glucosa en L (-) ácido láctico mientras que *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* va a transformar la glucosa en D (+) ácido láctico (Desmazeud, 1990). El ácido láctico le confiere a la leche fermentada un sabor ligeramente acidulado.

Según Tamime y Robinson (1991), el ácido láctico es importante en la elaboración de yogur ya que contribuye a la desestabilización de las micelas de caseínas (que están complejadas con las proteínas del suero lácteo, desnaturalizadas en el tratamiento térmico), mediante el paso del fosfato cálcico y los citratos, pertenecientes a la micela de caseína (desmineralización), de un estado coloidal a una

forma soluble. Según Romero del Castillo Shelly y Lagarriga (2004), durante el intervalo de pH entre 6,6-5,3 el tamaño de las micelas se mantiene constante, pero en el intervalo 5,3-4,6 o inferior, el tamaño de las micelas va decreciendo gradualmente. A medida que el pH desciende aproximándose al punto isoeléctrico de las caseínas (4,6-4,7), se van neutralizando las cargas negativas de las micelas de caseína (las cuales son responsables de la estabilidad de la caseína en la leche), que se aproximan y comienzan a coalescer. Cuando se alcanza el pH del punto isoeléctrico, las caseínas junto con las proteínas del lactosuero desnaturalizadas forman un gel constituido por una red de estructura regular que atrapa en su interior el resto de los componentes de la leche, incluyendo el agua (Ferrari Costa, 2015).

Según Béal *et al*, 1999, el pH final influencia significativamente las concentraciones bacterianas. Las concentraciones de *Lb. delbrueckii* son más altas en los yogures que se detuvieron a pH 4,4 que a pH 4,8, lo que indica que *Lb. delbrueckii* es más resistente a las condiciones ácidas, pero el crecimiento de *St. thermophilus* ya se detiene a pH 4,8. El efecto del pH sobre *St. thermophilus* se relaciona con una ligera disminución de las concentraciones celulares entre pH 4,8 y 4,4.

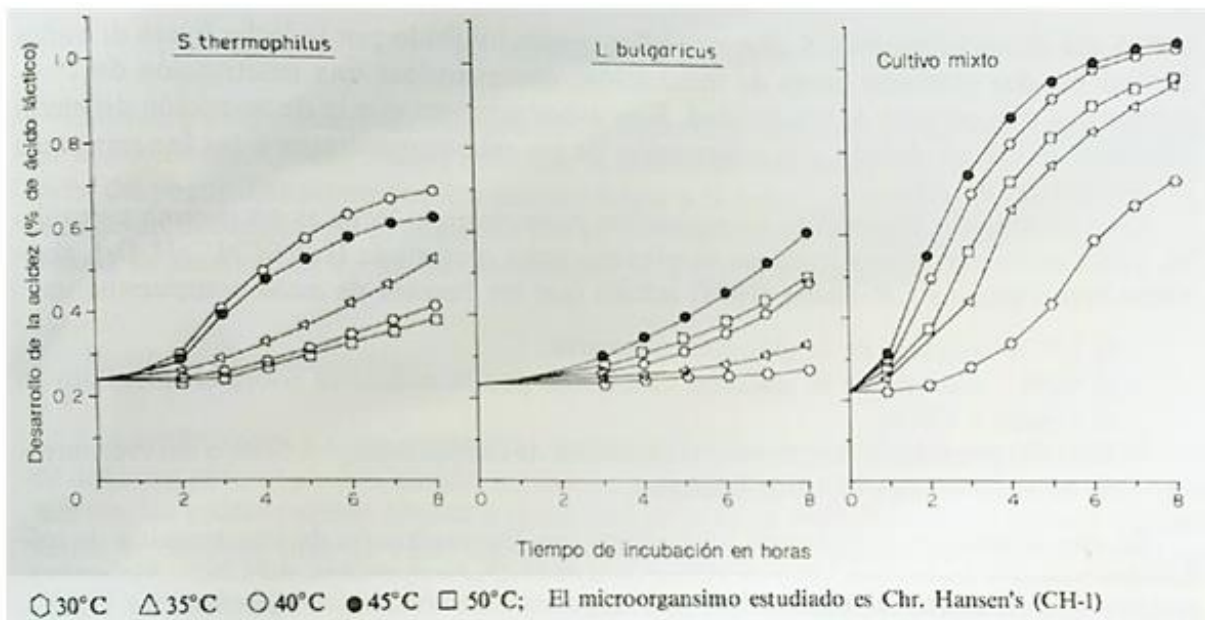


Figura 16. Comportamiento de cepas de cultivos de yogur puras y mixtas incubadas a diferentes temperaturas en leche desnatada tratada en autoclave con una tasa de inoculación del 2%. Fuente: Tamime y Robinson, 1991.

Cuando se combinan en un mismo cultivo ambas bacterias lácteas, se da una simbiosis generando que, en ciertas proporciones, originen más ácido láctico que la suma de ambas individualmente (Figura 16). *Lb. delbrueckii* libera, a partir de las proteínas lácteas, diversos aminoácidos (entre ellos valina, ácido glutámico, triptófano y metionina) y algunos péptidos que estimulan el crecimiento de *St. thermophilus*. A su vez, esta bacteria produce formiato durante el metabolismo de la lactosa y CO₂ a partir de la urea presente en la leche. Ambos metabolitos estimulan el desarrollo del Lactobacilo (Figura 17) (Scaramal, 2010).

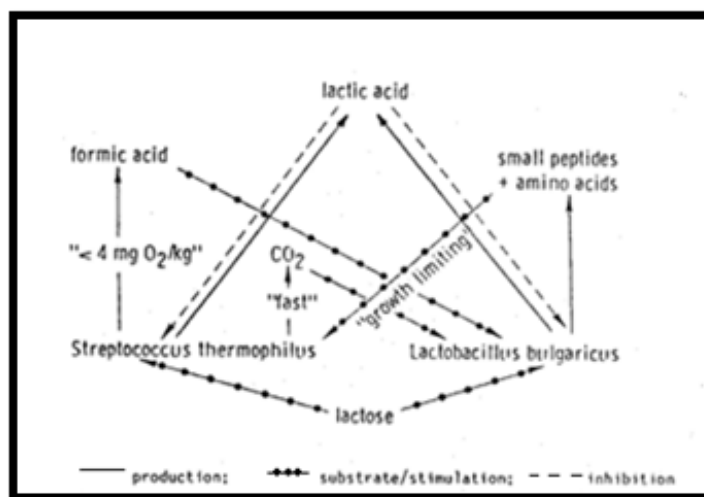


Figura 17. Simbiosis entre *St. thermophilus* y *Lb. delbrueckii*, relacionando los productos, sustratos e inhibidores que giran en torno a ambas cepas.

La sinergia entre *St. thermophilus* y *Lb. delbrueckii* se basa en sus características individuales. Cuando crecen juntas en la leche, *St. thermophilus* crece vigorosamente al principio, mientras que *Lb. delbrueckii* crece lentamente. *St. thermophilus*, debido a su gran actividad proteolítica, crea una abundancia de péptidos para estimular el crecimiento de *Lb. delbrueckii*. Durante la etapa temprana de la fermentación, la lactosa se transporta a través de la membrana celular de *St. thermophilus* con la ayuda de la enzima galactósido permeasa localizada en la membrana. La lactosa en la célula es hidrolizada por la enzima lactasa o β-galactosidasa. *St. thermophilus* produce niveles significativos de lactasa, que cataliza la hidrólisis de lactosa a glucosa y galactosa. La glucosa se convierte en piruvato que es metabolizado a ácido láctico por la enzima lactato deshidrogenasa. La disminución

de la tensión de oxígeno y el formiato (subproducto del metabolismo del *St. thermophilus*), a su vez, estimulan el crecimiento de *Lb. delbrueckii*, lo cual es ayudado adicionalmente por los aminoácidos liberados por las peptidasas activas secretadas por *St. thermophilus*. A través de actividades coordinadas en tándem, ambas bacterias aceleran la fermentación completa, que ninguno de ellos podría lograr individualmente. Cuando el pH del yogur se aproxima a 5,0, la actividad de *St. thermophilus* disminuye y *Lb. delbrueckii* domina gradualmente el proceso de fermentación total hasta que se alcanza el valor objetivo de pH y cesa el proceso de fermentación (Sfakianakis, Tzia, 2014).

Otra función de la fermentación es la generación de algunos de los productores del aroma del yogur. Según Tamime y Robinson (1991), estos compuestos pueden ser agrupados de la siguiente forma: ácidos no volátiles, como el láctico, pirúvico, oxálico o succínico; ácidos volátiles, como el fórmico, acético, propiónico o butírico; compuestos con grupos carbonilo, como diacetilo, acetoína, acetona y acetaldehído; un grupo heterogéneo de sustancias, entre las que se incluyen algunos aminoácidos y/u otros compuestos formados por degradación de las proteínas, la grasa o la lactosa por acción de la temperatura. Sin embargo existe un acuerdo general en la literatura sobre el hecho de que el aroma y el flavor del yogur se deben básicamente a la producción de ácido láctico y de compuestos carbonilos. *Lb. bulgaricus* es la especie fundamentalmente implicada en la liberación de acetaldehído (causante del aroma característico del yogur) (Scaramal, 2010). Aunque, sin embargo, en el crecimiento asociado de *St. thermophilus* y *Lb. delbrueckii*, la cantidad producida de acetaldehído es considerablemente aumentada comparada con lo que produce individualmente *Lb. delbrueckii*. Durante la fermentación, la formación de acetaldehído no se hace evidente hasta lograr un pH de 5,0, alcanzando un máximo a pH 4,2 y estabilizándose a pH 4,0 (Figura 18) (Gösta Bylund, 1995).

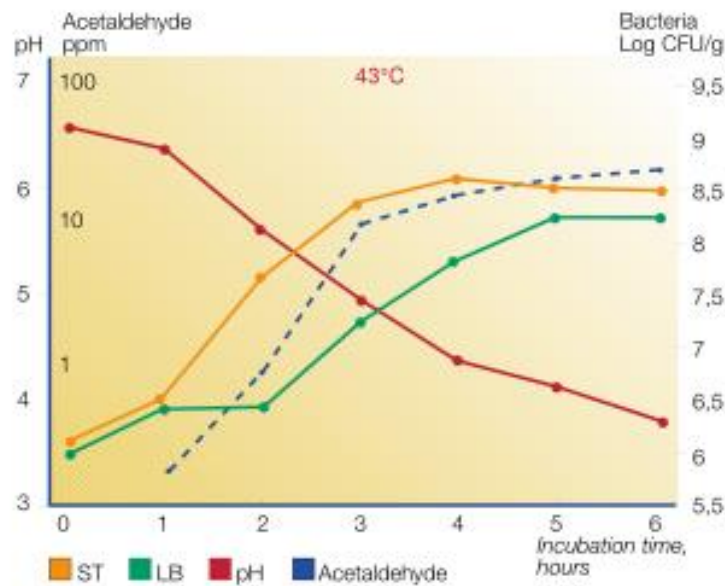


Figura 18. Crecimiento de *St. thermophilus* y *Lb. delbrueckii* junto con la concentración de acetaldehído a lo largo de la fermentación, en una incubación al 2,5 % (Gösta Bylund, 1995).

Según Desmazeaud (1990), el acetaldehído proviene en muy pequeñas cantidades de la degradación de la lactosa. Fundamentalmente proviene de las proteínas por la acción de las bacterias lácticas que conducen principalmente al aminoácido treonina. Particularmente, las cepas de *Lb. delbrueckii* poseen una actividad enzimática específica, llamada treonina aldolasa. Esta enzima desdobra la treonina en acetaldehído y glicina, otro aminoácido.

Algunas bacterias lácteas (tanto cepas de *Lb. delbrueckii* como de *St. thermophilus*) son capaces de sintetizar exopolisacáridos (EPS). Así, las cepas tienen una fisiología determinada, la cual las hace más o menos aromáticas, más productoras de exopolisacáridos, entre otras características. Este término describe todas las formas de polisacáridos bacterianos encontrados fuera de la pared celular. Son de cadenas alargadas y de masa molecular alta. Pueden estar sujetos a la célula bacteriana o encontrarse sueltos como material alrededor del medio. *Algunos fabricantes de yogur están interesados en la producción in situ de EPS para evitar el uso de estabilizantes y texturizantes* (Parra Huertas, 2010).

Los EPS producidos por BAL se pueden dividir principalmente en dos grupos: homopolisacáridos y heteropolisacáridos. Los primeros están compuestos de un solo tipo de monosacárido, mientras que los heteropolisacáridos consisten en múltiples tipos de monosacáridos (glucosa, galactosa, rhamnosa y manosa). Las cepas termofílicas de BAL, incluidas *Lb. delbrueckii* y *St. thermophilus*, producen EPS (Yildiz, 2010).

Uno de los factores que influye en la cantidad y tipo de EPS producidos es la composición de la base utilizada. Una misma cepa puede producir mayor cantidad de EPS cuando solo se modifica la composición de la base (dependiendo de la concentración de glucosa, lactosa, fructosa o manosa).

Otro parámetro influyente es la temperatura de fermentación, la cual, generalmente, cuando es menor a la temperatura óptima de la cepa involucrada, mayor es la producción de EPS. En la manufactura de yogur, los cultivos productores sintetizan la mitad de la concentración de EPS durante la fase de crecimiento exponencial, continuando el 50% restante luego de esta etapa. La producción depende mucho de la cepa (Bianchi y Salvadori, 1997).

Los EPS producidos por BAL durante la fermentación tienen impacto en la textura de los productos de leche fermentada. Los yogures elaborados con cultivos altamente productores de EPS muestran una mayor viscosidad y mouth thickness, textura suave, cremosidad y baja sinéresis (Yildiz, 2010). También pueden impactar en el carácter filante del yogur.

Estos polímeros han encontrado una importante aplicación en yogures bajos en grasa, y proporcionan viscosidad y propiedades gelificantes a bajas concentraciones.

Muchos defectos del producto, como la baja viscosidad y la alta sinéresis, son por lo general resueltos incrementando el número de sólidos totales o adicionando estabilizantes (almidón modificado, carragenina, gomas, entre otros), sin embargo, algunos creen que estos aditivos afectan el verdadero sabor, aroma y mouth thickness del yogur. Esto sugiere que el uso de cultivos productores de EPS pueda atraer a los consumidores que buscan un producto más natural (Teggatz y Morris, 1990).

Las características sensoriales del yogur han cambiado remarcablemente en los años recientes debido al requerimiento del consumidor de productos claramente dulces con una textura espesa. Este nuevo sabor llevó a la industria del yogur a aislar

cepas de Lb. delbrueckii y St. thermophilus con la habilidad de producir un producto considerablemente espeso [...]. Una buena textura puede ser obtenida aplicando distintas técnicas, entre las que se encuentra una muy conocida basada en la producción de polisacáridos por algunas cepas, tanto de Lb. delbrueckii como de St. thermophilus, que son llamadas cepas “viscosas” (Lavezzari, et al 1997).

1.3.4.2. Cultivos lácticos

Los cultivos de yogur contienen dos especies microbianas, *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* (cuyos antiguos nombres eran *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* respectivamente) (Figura 19 y Figura 20) denominadas cepas mixtas de estárter debido a que casi siempre se cultivan y resiembran juntas. Un cultivo definitivo debe contener el máximo número de células viables y estar libre de contaminantes como coliformes, mohos o levaduras (Tamime y Robinson, 1991).



Figura 19. *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* (Yildiz, 2010).

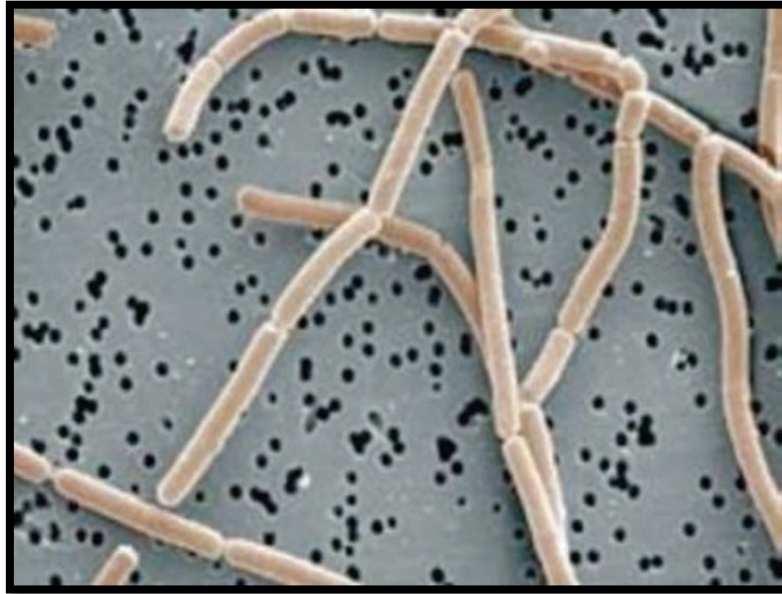


Figura 20. *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (Yildiz, 2010).

Estos cultivos pueden estar formados por una sola cepa de bacteria o por múltiples cepas, cada una con un efecto específico. El objetivo de las distintas cepas es producir el resultado deseado en la simbiosis, para que no compitan entre ellas. Por lo tanto deben ser complementarias en lo que respecta a este tema.

En la producción de yogur, uno de los factores más importantes que determinan la calidad del producto es el tipo de cultivo utilizado (Yildiz, 2010).

Según Gösta Bylund (1995), las empresas lácteas suelen comprar cultivos comerciales estárter listos para utilizar de las empresas productoras de insumos lácteos, las cuales se esfuerzan en investigar y desarrollar cultivos especiales para lograr el producto deseado, de manera que las empresas lácteas obtengan cultivos con propiedades selectas para alcanzar características especiales en su producto, como por ejemplo textura, flavor y viscosidad.

Según Scaramal (2010), el productor tiene la potestad de elegir qué iniciador es más conveniente para su yogur, aunque parece ser que el consumidor prefiere los yogures elaborados con cultivos estárter más aromáticos y que originan un producto más viscoso.

El yogur varía en sus distintas propiedades según el cultivo utilizado: sabor/aroma (acidez, acetaldehído, astringencia, entre otros), acidificación (velocidad

de fermentación, post acidificación en el proceso y en la vida útil) y textura/apariencia (mouth thickness, firmeza de gel, filancia, brillo, sinéresis) (Alem, 2015).

Un gran problema de investigación ha sido encontrar la mejor forma de tratar a los cultivos estériles de manera de preservar su actividad durante el almacenamiento. Cuanto menor es la temperatura, mejor se mantiene el cultivo.

Los cultivos pueden estar preparados de diversas formas: cultivos líquidos frescos, los cuales deben mantenerse refrigerados a 2-4°C, ya no utilizados en la actualidad; cultivos liofilizados, poseen una humedad menor al 2% (en polvo), son estables varios meses a temperatura ambiente y desde uno a dos años a temperatura de congelación (liofilizados-congelados) y cultivos ultracongelados, pueden ser concentrados o no concentrados, siendo estables solo a temperaturas menores a - 45 °C, durante un año.

Según Tamime y Robinson (1991), los cultivos de yogur liofilizados se obtienen mediante deshidratación de los cultivos lácteos previamente congelados. Este método permite aumentar la seguridad de los cultivos conservados, garantizando un elevado número de microorganismos viables y un máximo porcentaje de supervivencia durante su almacenamiento. Este proceso es más restrictivo ya que es cepa-dependiente, es decir, algunas cepas tienen rendimiento bajo y no se pueden utilizar industrialmente.

Los cultivos Direct Vat Set (D.V.S) son aquellos que se inoculan directamente en el tanque de fermentación, en cambio los cultivos REDI-SET son del tipo de inoculación semi-directa, siendo necesario propagar el cultivo entre 5 y 24 horas antes (Ferrari Costa, 2015).

La aplicación de cultivos DVS reduce el riesgo de infección de fagos al eliminarse el paso de la propagación requerido para los REDI-SET (Yildiz, 2010).

La Tabla IV muestra los tipos de cultivos que suelen ser más utilizados en la industria.

Tabla IV: Condiciones de almacenamiento y vida útil de algunos cultivos concentrados.

Fuente Chr. Hansen A/S, Dinamarca.

<i>Storage conditions and shelf lives of some concentrated cultures. (Chr Hansen A/S, Denmark)</i>		
Type of culture	Storage	Shelf life, months
1. Freeze-dried DVS	Freezer below -18°C	minimum 12
2. Deep-frozen DVS	Freezer below -45°C	minimum 12
3. Freeze-dried REDI-SET	Freezer below -18°C	minimum 12
1. Freeze-dried, superconcentrated culture (for direct inoculation of product)		
2. Deep-frozen		
3. Freeze-dried, concentrated culture (for preparation of bulk starter)		

Según Gösta Bylund (1995), gran parte de los yogures tienen una proporción de *St. thermophilus* y *Lb. delbrueckii* entre 1:1 y 2:1. No se debe permitir que el *Lb. delbrueckii* se encuentre en mayor proporción que los *St. thermophilus*, ya que el flavor será demasiado ácido. Uno de los factores que afecta esta proporción es la temperatura de incubación, la cual, a 40°C otorga una proporción de aproximadamente 4:1, mientras que a 45°C es de aproximadamente 1:2.

La temperatura óptima para la inoculación (e incubación) en la manufactura de yogur es de 43°C para alcanzar una proporción de cocos y bacilos de 1:1, con una concentración del inóculo de 2,5-3 % y un tiempo de incubación de 2,5-3 horas. (Figura 21) (Gösta Bylund, 1995).

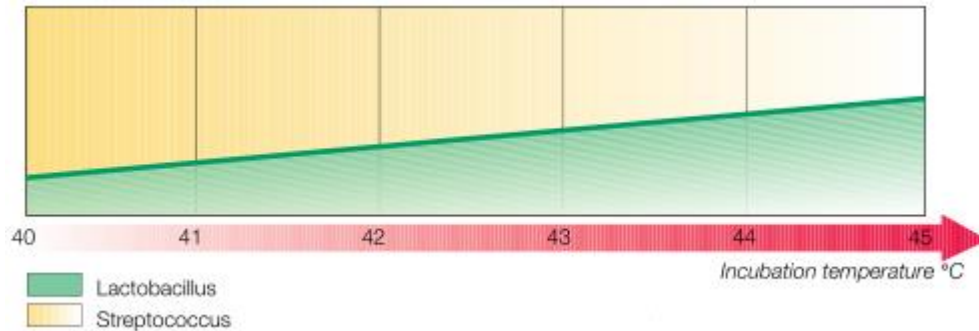


Figura 21. Efecto de la temperatura de incubación sobre la cantidad relativa de *St. salivarius ssp. thermophilus* y *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* a dosis y tiempo de incubación constantes (Gösta Bylund, 1995).

En la Figura 22 se puede observar las diferentes curvas de acidificación según la temperatura de fermentación utilizada, destacándose que las curvas con temperatura superior a 40°C alcanzan el pH de corte más rápidamente que aquellas a 35°C. También se destacan las tres fases que experimentan las dos cepas de BAL a lo largo de esta etapa.

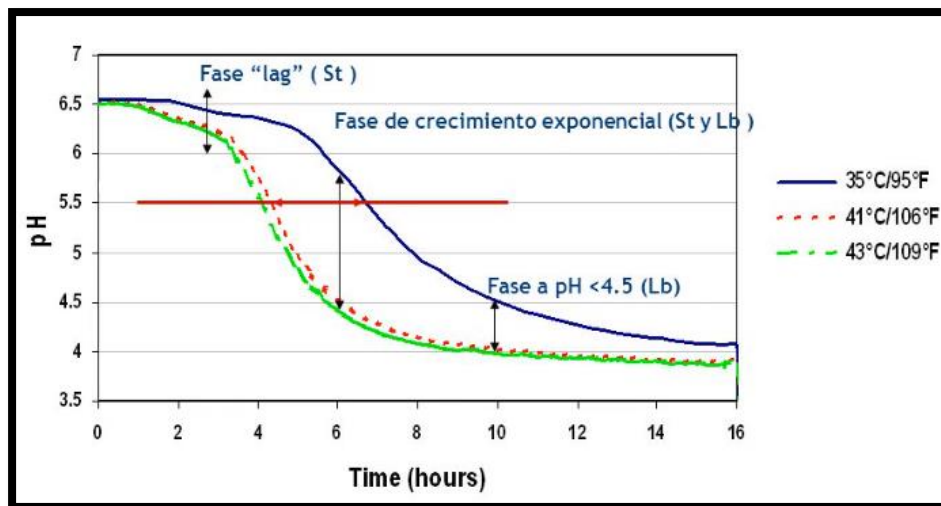


Figura 22. Actividad acidificante a distintas temperaturas de fermentación con sus respectivas etapas. Fuente: Alem, 2015.

1.3.5. Enfriamiento y almacenamiento

La quinta etapa es el enfriamiento del coágulo. Si bien el envasado se encuentra entre el enfriamiento del yogur y el almacenamiento del mismo en cámaras de refrigeración, para facilitar la explicación se hablará de estas dos etapas en conjunto.

Al final de la incubación, una vez alcanzado el pH de corte, el yogur bebible debe ser enfriado. El objetivo básico es reducir la actividad metabólica del cultivo estárter luego de la rotura del coágulo hasta el envasado (post acidificación durante el proceso), evitando que el producto obtenga una acidez inaceptable. Esto es crítico en estanques de gran capacidad.

Según Tamime y Robinson (1991), existen dos tipos de enfriamiento: enfriamiento en una sola fase y enfriamiento de dos fases. El enfriamiento en una sola fase consiste en enfriar directamente desde la temperatura de incubación hasta la temperatura de almacenamiento (10 °C o menos), basándose en que el coágulo tiene menos alteraciones durante el envasado. En cambio, el enfriamiento de dos fases consiste en enfriar el yogur de la temperatura de incubación a aproximadamente 24°C, para luego en una segunda fase enfriar el yogur, ya envasado, en cámaras de refrigeración a 10°C o menos. Este enfriamiento final en el envase, mejora notablemente la viscosidad del producto tras uno o dos días de almacenamiento en reposo. Se cree que este método mejora notablemente la calidad del yogur batido.

La refrigeración del yogur a temperaturas menores a 10 °C retarda las reacciones bioquímicas y biológicas que tienen lugar en el producto. Las reacciones biológicas son el resultado de la actividad metabólica de los estárteres del yogur y, posiblemente, de los microorganismos contaminantes que resisten el tratamiento térmico y los procesos de fermentación, o bien contaminaron el producto tras su elaboración, por ejemplo: levaduras y mohos. Las reacciones bioquímicas incluyen: oxidación de las grasas en presencia de oxígeno, hidratación de las proteínas, ligera deshidratación con el consiguiente cambio de aspecto del yogur, mejora de la viscosidad y consistencia del yogur durante el almacenamiento, gracias a la hidratación de los estabilizantes añadidos (en este caso almidón modificado y gelatina). (Tamime y Robinson, 1991).

Un tema muy importante que destacar, entre la etapa de enfriamiento y el envasado, es el tratamiento mecánico (pérdida de carga) que sufre el producto. El

yogur debe tener un tratamiento mecánico leve para lograr una correcta consistencia en el producto final. *Los distintos elementos de la línea de procesado de yogur esta conectados entre sí por una serie de tuberías y accesorios, válvulas y, a veces, filtros, pudiendo causar el paso por estos elementos alteraciones de la estructura del coágulo del yogur. Es aconsejable que las tuberías instaladas entre los tanques de fermentación y las envasadoras, sean de gran diámetro y lo más cortas posibles.* (Tamime y Robinson, 1991). Preferiblemente utilizar bombas de tornillo o lobuladas, no centrífugas ya que destruye el producto.

Según Gösta Bylund (1995) el enfriamiento con intercambiador de calor de placas asegura un tratamiento mecánico que no daña el producto.

1.3.6. Envasado

La sexta etapa del proceso es el envasado. Según Tamime y Robinson (1991), los envases utilizados para la comercialización del yogur deben resistir a los ácidos, evitar pérdida de las sustancias volátiles responsables del aroma del yogur y ser impermeables al oxígeno ya que este favorece el crecimiento de hongos y levaduras. Los materiales que pueden utilizarse son: polietileno (PE), polipropileno (PP), poliestireno (PS), cloruro de polivinilo (PVC) y cloruro de polivinilideno (PVDC).

1.4. Seguimiento

En esta sección se hablará acerca de los parámetros de seguimiento que se estudiaron en el proyecto, los cuales son: post-acidificación, reometría (viscosidad) y recuento de bacterias acidolácticas.

Uno de los principales problemas de calidad con el yogur es que la actividad de las bacterias lácticas continúa después de la entrega al minorista, y el producto puede ser demasiado ácido cuando se consume; el sabor ácido tiende a ser más pronunciado en el yogur bajo en grasa. Además, el yogur puede volverse amargo debido a una proteólisis excesiva; esto también dependería de las cepas iniciales utilizadas. El desarrollo de estos defectos generalmente determina la vida útil del yogur. Ciertamente, el producto se enfría para ralentizar la acidificación, pero es difícil

enfriarlo lo suficientemente rápido. Incluso a temperaturas de refrigeración, la acidificación y otros cambios causados por los sistemas de enzimas continúan, aunque lentamente (Walstra *et al*, 2006).

1.4.1. Post-acidificación

Las bacterias lácticas, aún después del crecimiento, pueden continuar acidificando en frío, esto es lo que se conoce como post-acidificación (Desmazeaud, 1990).

Un yogur evidencia post-acidificación cuando, tras haber llegado a un pH de corte de 4.6, las bacterias lácticas continúan replicándose lentamente, metabolizando y produciendo una lenta pero progresiva acidificación (Taboada, 2016).

Se produce la disminución del pH, la cual puede explicarse por la actividad metabólica persistente de las bacterias ácido lácticas durante el enfriamiento. La post-acidificación se ve afectada por la asociación de cepas utilizadas, el pH final de la fermentación y la composición proteica de la base blanca (Beal *et al*, 1999).

En esta etapa es clave que el cultivo otorgue la suficiente estabilidad de pH como para poder controlarlo, evitando dar como resultado yogures demasiado ácidos. Al final de la etapa de post-acidificación, la acidez del yogur oscila entre 0,85 % hasta 1,20 % (según el tipo de yogur). Estos niveles de acidez están muy por debajo del rango de tolerancia de *Lb. delbrueckii*, principal cepa involucrada en esta etapa, por lo tanto es clave paralizar el proceso mediante enfriamiento con el fin de reducir la actividad metabólica de los microorganismos y retener las propiedades reológicas del producto. Así y todo, ambas cepas continúan siendo bioactivas, produciendo ácido láctico incluso después del enfriamiento. Esto lleva a que el pH pueda alcanzar valores menores a 4,0, provocando alteraciones en el sabor (demasiado ácido) y reducción de la vida útil del producto. Es por esto que actualmente el productor busca productos más suaves, con baja post-acidificación, buena consistencia y textura (Taboada, 2016).

1.4.2. Reometría

Las propiedades reológicas del gel se ven afectadas por la composición de la base láctea, la temperatura y el tiempo del tratamiento térmico. También se ve afectada por el tipo y cantidad de cultivo utilizado, por la temperatura de fermentación, por la agitación del gel y por las condiciones de almacenamiento hasta el final de la vida útil del producto (Marafon *et al*, 2011). La acidez y bajo pH resultante de la fermentación láctica inducen cambios estructurales significativos que son responsables de la textura del yogur y sus características reológicas únicas (Madeiros *et al*, 2015).

Los atributos físicos de los yogures, incluida la falta de separación visual del suero de leche y la viscosidad percibida, son aspectos cruciales de la calidad y la aceptación sensorial general del consumidor de los yogures (Lee y Lucey, 2010).

Las propiedades físicas de los geles de yogur pueden explicarse cualitativamente usando un modelo para interacciones de caseína que enfatiza un equilibrio entre atracciones (por ejemplo: atracciones hidrofóbicas, enlaces cruzados de caseína aportados por nanoclusters de fosfato de calcio y enlaces puente disulfuro covalentes entre caseínas y proteínas de suero desnaturalizadas) y repulsiones (por ejemplo: cargas electrostáticas o cargas, principalmente, negativas al inicio de la fermentación) (Lee y Lucey, 2010).

Como se mencionó anteriormente, un problema de proceso es la baja viscosidad, la cual suele ser resuelta incrementando el total de sólidos o añadiendo estabilizantes tales como almidón modificado, gelatina, carragenina, entre otros. Sin embargo, algunos creen que estos aditivos afectan el verdadero gusto a yogur, aroma y sensación en boca. Es por esto que cultivos que otorgan buena viscosidad al yogur son un beneficio potencial para los productores (Teggatz y Morris, 1990), sobre todo en países donde el uso de estabilizantes no está permitido para la elaboración de yogur como por ejemplo Colombia. Existen cepas de *St. thermophilus* y *Lb. delbrueckii* cuyo uso permite la elaboración de yogur tipo batido con adecuadas características de viscosidad y textura y sin problemas de sinéresis. Esto representa una gran ventaja económica ya que permite el ahorro de estabilizantes y una ventaja legal en los países donde no se permite el uso de estabilizantes (Garibay *et al*, 1993).

La textura del yogur se ve influenciada principalmente por el tratamiento térmico de la base blanca, el cultivo inicial, la composición proteica de la base, los estabilizantes, tratamiento mecánico y sistema de enfriamiento.

La reometría es el estudio de flujo y deformación de la materia. Es importante para la calidad sensorial del alimento, asociado con la percepción del flavor y la sensación en boca.

Para definir los parámetros más importantes de la reología se utiliza el modelo de la Figura 23.

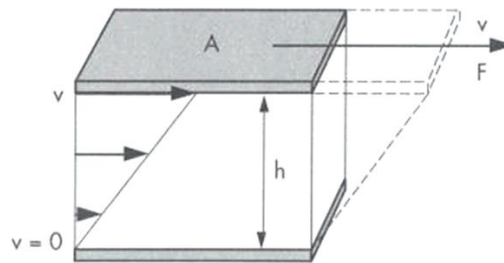


Figura 23. Flujo laminar. La muestra se adhiere de igual forma a ambos platos (Wind, 2013).

El plato superior, con un área (de deformación) A, es puesto en movimiento por una fuerza (de deformación) F y con una velocidad resultante V, la cual es medida. El plato inferior es estacionario (V=0), “h” es la distancia entre los dos platos. De aquí se precisan los parámetros más importantes de la reología: shear rate (también llamado velocidad de corte, velocidad de cizalla o gradiente de deformación [$\dot{\gamma}$]), que se define de la siguiente forma:

$$\dot{\gamma} = \frac{v}{h} \quad [1/segundo] \quad (1)$$

y shear stress (también conocido como esfuerzo de corte, esfuerzo de cizalla, o esfuerzo tangencial [τ]) que se define de la siguiente forma:

$$\tau = \frac{F}{A} \quad [Pascales] \quad (2)$$

Cabe tener en cuenta que el estrés mecánico o “shear stress” se correlaciona con el “mouth thickness”, determinado por un panel sensorial (Taboada, 2016).

La viscosidad se define como la resistencia de un líquido a fluir, o bien como la relación:

$$\text{Viscosidad} = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} [\text{Pascales} \cdot \text{segundo}] \quad (3)$$

En esta investigación se analizará la evolución del shear stress a distintos valores de shear rate.

Existen distintas clasificaciones de sistemas reológicos. El yogur es un fluido no newtoniano, es decir la viscosidad no es directamente proporcional a la velocidad de desplazamiento, varía con ella y en ciertos sistemas depende del tiempo (Scaramal 2010). Dentro de esta clasificación, el yogur es tixotrópico, siendo una transición reversible gel-sol-gel, lo que quiere decir que si ese gel se agita pasa a sol y si luego se deja en reposo vuelve a gelificar. La tixotropía se caracteriza por un descenso de la viscosidad en el tiempo mientras se le practica esfuerzo de corte y su vuelta al valor original en el reposo. Esta “vuelta” no es instantánea, sino que ocurre luego de un período de reposo, conociéndose este fenómeno como histéresis. Aunque, según Aswal *et al* (2012), el yogur no presenta un comportamiento verdaderamente tixotrópico ya que la destrucción estructural, producto de la deformación, no es completamente reversible una vez que la deformación se detiene.

*La viscosidad se correlaciona con el estado estructural del material y disminuye al aumentar la velocidad de corte. Este comportamiento de flujo es adelgazante o pseudoplástico, como lo describen muchos autores para el yogur (Barnes *et al*, 1993; De Lorenzi *et al*, 1995). Cabe aclarar que los fluidos pseudoplásticos son aquellos que disminuyen su viscosidad al aumentar la velocidad de deformación aplicada. Experimentalmente es complicado ver la diferencia entre un fluido pseudoplástico y uno tixotrópico, máxime cuando la mayoría de los fluidos tixotrópicos son pseudoplásticos (Harris *et al*, 2016).*

1.4.3. Recuento de bacterias ácido-lácticas

Con respecto al crecimiento de las bacterias ácido-lácticas en el yogur, podemos detallar las siguientes consideraciones: en el comienzo de la fermentación *St. thermophilus* se encuentra en condiciones óptimas de crecimiento, de manera que saltea la fase de latencia y pasa directamente a la fase de crecimiento exponencial. Sin embargo, *Lb. delbrueckii* no crece bien en estas condiciones ya que su crecimiento es mayor a pH más ácido y su fase de latencia es más larga. Cuando la base alcanza un pH de 6, bajo estas condiciones, el *St. thermophilus* comienza la fase estacionaria llegando incluso al declive. Como *Lb. delbrueckii* tiene un pH óptimo de crecimiento de 5,5, se dispara su fase de crecimiento exponencial, haciendo que la producción de ácido láctico sea máxima alcanzando un pH de 4,5. A este pH, *Lb. delbrueckii* llega a la fase estacionaria, sin crecimiento neto (Figura 24) (Perales, 2010). Es aquí donde puede observarse el efecto de la simbiosis entre estas dos cepas, ya que *St. thermophilus* le otorga las condiciones necesarias de acidez para que *Lb. delbrueckii* alcance su fase de crecimiento exponencial.

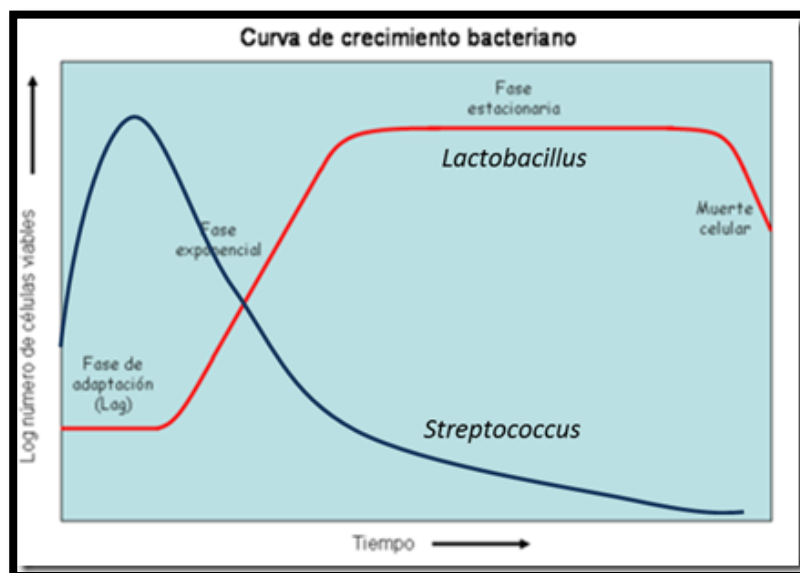


Figura 24. Evolución del número de bacterias ácidolácticas (Log) (Perales, 2010).

Según la investigación realizado por Rajiv (1998), *St. thermophilus* aumenta su cantidad hasta 5-10 días de producido el yogur para luego a partir de ahí, comenzar a

decrecer. Así y todo, se encontró que *St. thermophilus* era el más estable y el de menor pérdida de microorganismos viables. Por el lado de *Lb. delbrueckii* se observó un incremento del número de bacterias hasta los 5 días luego de producido para luego disminuir. Se encontró que la disminución fue mayor para este organismo obteniendo cantidades menores a 10^5 UFC/g después de 15-20 días de producido el yogur.

Además, se observó una supervivencia mayor al 50% en los yogures envasados en recipientes plásticos con respecto a los envasados en los recipientes de vidrio. Esto puede ser debido a la menor permeabilidad al oxígeno que existe en los envases de vidrio.

Según Yilmaz-Ersan y Kurdal (2014), los recuentos de *Lb. bulgaricus* disminuyeron a lo largo del tiempo de almacenamiento, resultando los más altos en el primer día, mientras que los valores más bajos fueron en el día 25.

HIPÓTESIS

2. Hipótesis

Hipótesis 1: La elección del cultivo impacta significativamente sobre las propiedades del producto final.

Hipótesis 2: La modificación de un determinado parámetro de producción impacta significativamente sobre las propiedades del producto final.

METODOLOGÍA

3. Metodología

Para el proyecto se eligió yogur del tipo bebible, como se aclaró anteriormente.

Se llevó a cabo el proceso productivo de yogur bebible sin pulpa de frutas ni esencias (base blanca) a escala reducida (planta piloto) utilizando dos temperaturas de enfriamiento distintas por cada cultivo utilizado: 24°C y 10°C. A la vez, se almacenaron a dos temperaturas distintas: 25°C y 10°C, obteniéndose así 4 productos finales por cada tipo de cultivo, siendo un total de 16 productos finales distintos (Figura 25).

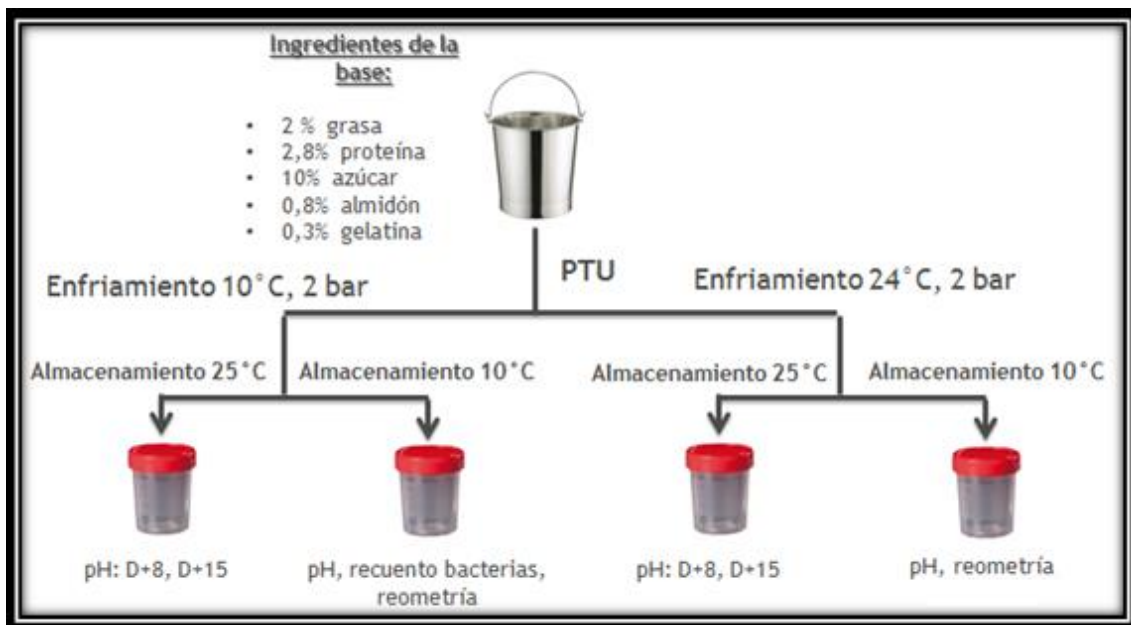


Figura 25. Esquema de los parámetros de producción utilizados y los ingredientes de la base.

A todos los prototipos obtenidos se les realizó un seguimiento a lo largo de su vida útil que posteriormente será explicado.

Tanto el proceso productivo como el seguimiento del yogur se realizaron por triplicado, de manera que los datos posean validez estadística y reproducibilidad.

En el Anexo B se puede observar el cronograma del total de la etapa práctica del proyecto, tanto de las tres elaboraciones realizadas como de sus respectivos parámetros analizados a lo largo de la vida útil.

Se optó por la elección de una base que contuviera la menor cantidad de materias primas de manera de afectar lo menos posible el comportamiento de los cultivos pero,

a la vez, intentando respetar los ingredientes básicos y las cantidades más utilizados en Latinoamérica.

Todos los ingredientes en las tres elaboraciones fueron del mismo lote, a excepción de la leche y la crema por una cuestión de conservación.

Se utilizó una base blanca, es decir, que entre los ingredientes no se incluyen: saborizantes, colorantes, agregados (frutas enteras, trozadas, en pulpa, jaleas de fruta, pastas, cereales) ni ningún otro ingrediente como por ejemplo reemplazantes de grasa, complejos vitamínicos, entre otros.

3.1. Estandarización de las proteínas y materia grasa de la base.

Como se mencionó anteriormente, la composición de la base fue la siguiente: 2,80% de proteínas, 2,00% de materia grasa (ambas aportadas por la leche descremada y la crema), 0,3% de gelatina (210 bloom), 10% de azúcar y 0,8% de almidón modificado.



Figura 26. Equipo MilkoScan Foss. Utilizado para obtener porcentajes de proteínas y materia grasa de la leche.

Cabe aclarar que, si bien los siguientes cálculos y mediciones se realizaron para las tres elaboraciones, se mostrarán a continuación los de la primera elaboración. A la leche bovina cruda descremada se le midió porcentaje de proteínas y materia grasa mediante el equipo MilkoScan Foss (Figura 26), el cual otorgó 3,55% de proteínas y 0,08% de materia grasa.

Se utilizó crema comercial, obteniendo su porcentaje de proteínas y materia grasa a través del rótulo: 2,00% de proteínas y 36,00% de materia grasa.

Para los cuatro cultivos utilizados se partió de la misma base, la cual se va a separar para cada cultivo en el momento del llenado de los tanques de fermentación (se utiliza un tanque para cada cultivo estárter).

La cantidad de base preparada fue de 30 kg debido a que cada tanque de fermentación tiene una capacidad de 5 L y se consideran pérdidas durante las distintas etapas del proceso productivo. Como aclaramos anteriormente, esta base poseía 2,80% de proteínas y 2,00% de materia grasa.

3.1.1. Cálculo de los porcentajes de cada ingrediente de la base.

Consideramos la base de 100 kg para facilitar los cálculos, para luego extrapolarlos a los 30 kg que realmente se utilizaron.

Los 100 kg (100%) de base blanca están compuestos por 0,3 kg de gelatina, 10 kg de azúcar y 0,8 kg de almidón modificado y por una cantidad de leche descremada y crema que se calcula a continuación:

A los 100 kg totales se le restan los kg de ingredientes que no aportan proteína ni materia grasa:

$$100 \text{ kg} - (0,3 \text{ kg} + 10 \text{ kg} + 0,8 \text{ kg}) = 88,9 \text{ kg} \quad (4)$$

Por lo tanto, esos 88,9 kg deben contener el total de proteína y materia grasa del total de la base, es decir, 2,80 kg de proteína y 2,00 kg de materia grasa.

Para conocer las cantidades de leche descremada y crema se plantean los siguientes balances de masa:

$$2,80 \text{ kg de proteína} = M_{LD} * 0,0355 + M_C * 0,02 \quad (5)$$

$$2,00 \text{ kg de materia grasa} = M_{LD} * 0,0008 + M_C * 0,36 \quad (6)$$

Siendo M_{LD} y M_C la cantidad de materia de leche descremada y crema respectivamente.

Luego de la resolución de los balances se obtiene: $M_{LD} = 75,84$ kg y $M_C = 5,39$ kg.

Para alcanzar los 88,9 kg, faltarían 7,66 kg, los cuales serán aportados por agua.

Como los cálculos se realizaron considerando una base de 100 kg, podemos utilizar estas cantidades como porcentajes de ingredientes en la base.

TABLA V: Porcentajes de ingredientes de la base

Leche descremada	75,84 %
Crema	5,39 %
Azúcar	10,00 %
Agua	7,66 %
Almidón	0,80 %
Gelatina	0,31 %

Haciendo uso de los porcentajes, se calculó la cantidad de ingredientes para la base de 30 kg, especificando los kg de proteína y materia grasa aportado por cada ingrediente.

TABLA VI: Cantidad de ingredientes de la base

INGREDIENTES	CANTIDAD	PROTEÍNA (%)	PROTEÍNA	MATERIA GRASA (%)	MATERIA GRASA
Leche descremada	22,75 kg	3,55	0,808 kg	0,08	0,018 kg
Crema	1,62 kg	2	0,032 kg	36	0,582 kg
Azúcar	3,00 kg	-	-	-	-
Agua	2,30 kg	-	-	-	-
Almidón	0,24 kg	-	-	-	-
Gelatina	0,09 kg	-	-	-	-

Se pesaron los ingredientes de la base. Para el caso de la leche descremada se utilizó una balanza comercial Mettler Toledo Wildcat, mientras que los demás ingredientes se pesaron en balanza Sartorius ED4202S. Una vez pesado todos los ingredientes, se los mezcló en baldes, los cuales se llevaron a un agitador Silverson L4RT por 5 minutos a 6.000 rpm para lograr una correcta mezcla, de manera de evitar que quedara remanentes en los baldes.

3.2. Homogeneización

Para esta etapa se empleó el equipo GEA Ariete NS2006 (Figura 27).



Figura 27. Homogeneizador GEA Ariete NS2006.

Este equipo se abastece de un tanque de agitación de 50 L de capacidad, seteado a una velocidad de agitación de 75 rpm, en el cual se vertió previamente la mezcla. A medida que el tanque se vacía y comienza a pasar por el homogeneizador, se regula el caudal y se le otorga la presión en dos estadios, el primero hasta 50 bar y el segundo hasta alcanzar 200 bar de presión y una temperatura de 60 °C. Esta temperatura es la óptima para la homogenización, como se destacó previamente. El equipo está directamente conectado con el pasteurizador a través del mismo circuito (Figura 29). Como medida de seguridad, el equipo sólo permite el paso de la mezcla por el homogeneizador (y posteriormente al pasteurizador) cuando se alcance una temperatura mayor a 90 °C en el pasteurizador.

3.3. Pasteurización

Para esta etapa se empleó el equipo GEA (Figura 28 y 29).



Figura 28. Pasteurizador GEA.

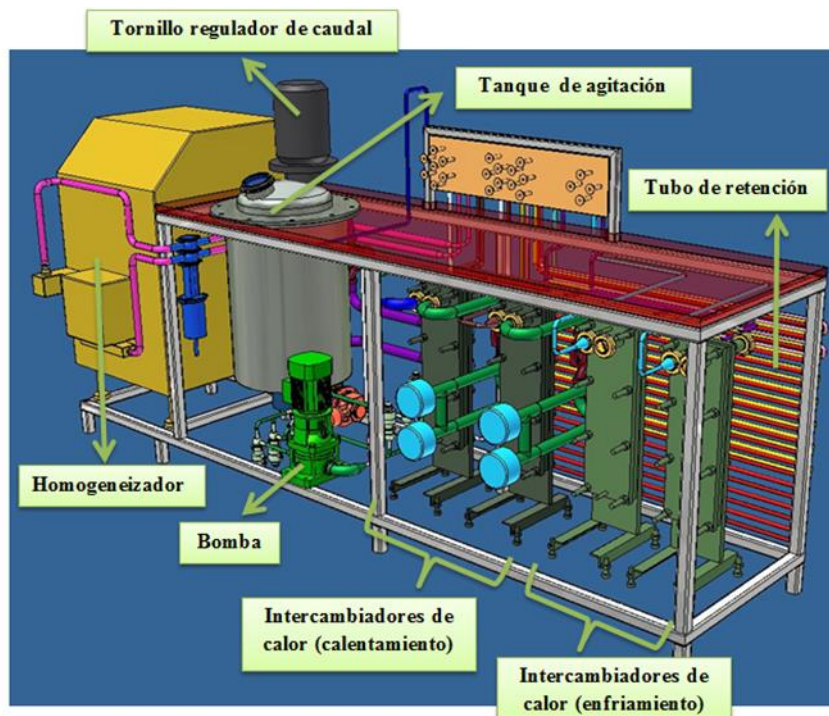


Figura 29. Esquema de las partes del homogeneizador-pasteurizador.

Cuenta con 4 intercambiadores de calor agua-leche (dos para calentamiento y dos para enfriamiento).

Con respecto a los intercambiadores de calor utilizados para calentamiento, uno de ellos se utiliza para calentar la mezcla (a 60 °C) previo al ingreso al homogeneizador y el otro para llevar la muestra a la temperatura de pasteurización, previo al ingreso al tubo de retención.

Por otro lado, los intercambiadores utilizados para enfriamiento se utilizan para llevar la mezcla pasteurizada, ya sea a temperatura de fermentación (en caso que se fermente al instante luego de haber pasteurizado) o a temperatura de refrigeración (en caso que la fermentación se realice en otro momento).

Se seteo la temperatura de pasteurización a 92 ± 1 °C y un tiempo de retención de 5 minutos (temperatura muy alta, tiempo breve, VHTST). El mismo equipo permite enfriar la base al instante de haber sido pasteurizada. Como en este caso la producción se llevó a cabo en dos días, se estableció enfriar la base hasta alcanzar los 6 °C, recogiendo, a la salida del equipo, la base en los cuatro tanques de fermentación. Estos tanques son almacenados en cámaras frigoríficas a 7°C hasta el día siguiente.

3.4. Cultivos empleados y Fermentación

Para este proyecto se seleccionaron cuatro cultivos comerciales de la empresa Chr. Hansen, que se codificaron: CH-AR-015, CH-AR-021, CH-AR-037, CH-AR-058 por cuestiones de privacidad. En las tres elaboraciones se utilizaron cultivos del mismo lote.

El cultivo CH-AR-021 es el único de los cuatro que se presenta congelado-liofilizado y se encuentra envasado en bolsas trilaminadas. En cambio, los otros cultivos, se presentan como ultracongelados, conservados a una temperatura inferior a -45 °C. (Gösta Bylund, 1995) y se encuentran envasados en TetraPack®. Todos los cultivos son Direct Vat Set (DVS), o sea, que se inoculan directamente en el tanque de fermentación.

Se estableció que el inóculo se encuentre a una concentración de 0,02 % p/v, en la base, tanto para el caso de los cultivos ultracongelados (CH-AR-015, CH-AR-037, CH-AR-058) como para el cultivo liofilizado (CH-AR-021).

En el caso de los cultivos ultracongelados, se disuelven 200 gramos (previo derretimiento de este) en un matraz de 500 mL con leche comercial. Se disuelve mayor

cantidad de cultivo que la necesaria debido a que el cultivo está formado por mezcla heterogénea de sólidos, lo que hace necesario tomar una cantidad lo suficientemente grande para que sea representativa del cultivo.

Como cada tanque de fermentación es de 5000 mL y la concentración requerida en los cultivos ultracongelados es la anteriormente citada, se necesita 1 gramo de cultivo. Como el matraz posee 200 gramos de cultivo en 500 mL, para obtener 1 gramo de cultivo se necesitan 2,5 mL de la dilución del matraz, la cual se inocula en los tanques de fermentación.

Por otro lado, para el cultivo liofilizado (CH-AR-021) el procedimiento establece disolver 50 gramos de cultivo en un matraz de 500 mL, utilizando, también, leche UHT comercial o agua peptonada. Al igual que en los cultivos ultracongelados, se requiere 1 gramo de cultivo por tanque, pero en este caso, como la concentración de la dilución del matraz es menor, se inoculan 10 mL de la dilución del matraz en los tanques de fermentación.

Tanto para el cultivo liofilizado como para los ultracongelados, la metodología es la misma, exceptuando que en el caso del liofilizado, no es necesario esperar a que se descongele para ser utilizado, pero el cultivo debe ser mezclado con poca cantidad de leche en Stomacher, previo a la disolución en matraz aforado.

Se pesó el cultivo en balanza Sartorius ED4202S, para luego diluir con leche comercial en bolsas estériles para digester mezcladas en Stomacher durante 2 minutos. Luego, se traspasó el contenido a un matraz de 500 mL, lavando repetidas veces la bolsa para evitar remanentes y se llevó el matraz hasta volumen. Se tomó mediante pipeta descartable estéril los mL necesarios de la mezcla para luego ser inoculada en los respectivos tanques de fermentación. Se debe registrar la hora exacta en la cual se inocula cada tanque ya que desde ese momento los cultivos comienzan a actuar. Toda la etapa de inoculación se realizó bajo flujo laminar para evitar contaminaciones de cualquier tipo.

Posteriormente, se separó una pequeña cantidad de la base inoculada en un recipiente plástico con el objetivo de introducir en el mismo el electrodo del equipo CINAC Alliance, previamente calibrado con soluciones buffer Merck pH: 7,00 y 4,00 (Figura 30), de manera que el tanque se mantenga herméticamente cerrado durante toda la fermentación, pero exista un seguimiento en paralelo de su acidificación.



Figura 30. Tanques de fermentación y recipientes plásticos en baño térmico, junto al equipo CINAC Alliance.

Este equipo realiza un seguimiento de la evolución del pH en función del tiempo (en minutos), efectuando una medición de pH cada 4 minutos, y también muestra la variación de la velocidad de acidificación de la base. A la vez, otorga datos acerca de distintos puntos característicos (Feature points): tiempo de latencia (tiempo necesario para reducir el pH 0,08 unidades), tiempo transcurrido desde el comienzo de la fermentación hasta alcanzar el pH de corte (4,6), pH luego de transcurrido 20 horas (desde el comienzo de la fermentación), y tiempo que el yogur permanece entre pH 4,7-4,5 a la temperatura de fermentación. Este último dato es importante para las industrias ya que los tanques de fermentación suelen ser de gran capacidad por lo que el tiempo de vaciado es considerable, generando que el producto continúe acidificándose a pH inferiores al de corte. Es por esto que los productores necesitan conocer el tiempo que tarda en descender el pH en esa etapa para evitar una sobre acidificación del producto, conocida como post acidificación en el proceso.

El equipo tiene la capacidad de otorgar el dato con 4 decimales. Tanto el tanque de fermentación como el recipiente plástico fueron calentados a baño maría a una temperatura de 42 °C (esta temperatura es un promedio entre las temperaturas óptimas para los dos microorganismos: *S. thermophilus* 37 ° C y *L. bulgaricus* 45 ° C [Yildiz, 2010]) hasta alcanzar el pH de corte: 4,6. Una vez alcanzado el pH de corte, se retiraron los tanques del baño térmico y se procedió a la ruptura del coágulo manualmente dentro de los tanques de fermentación, hasta obtener consistencia líquida

del yogur. Este mismo método utiliza Damin *et al* (2008), donde se agitó manualmente con un disco perforado de acero inoxidable con movimientos hacia arriba y hacia abajo durante aproximadamente 1 minuto.

3.5. Pérdida de carga y Enfriamiento

La temperatura del agua de enfriamiento no debería tener menos de 5 °C por encima de la temperatura deseada de enfriamiento del producto, esto es debido a que un choque térmico demasiado grande podría cristalizar algunos fragmentos grasos, y con el bombeo podríamos dañar los glóbulos grasos (Ferrari Costa, 2015).

Se vertió el contenido del tanque, luego de la rotura del coágulo, en el equipo PTU Scandinox (Figura 31). En dicho equipo se simula la pérdida de carga que ocurre en las cañerías entre la etapa de fermentación y la línea de envasado y enfriamiento. Este equipo contiene una bomba mono o de tornillo.



Figura 31. PTU Scandinox.

Como se aclaró anteriormente, existen dos sistemas de enfriamiento que suelen ser los más utilizados por las industrias lácteas: de una etapa, aquél en el que se enfría directamente hasta temperatura de refrigeración (en nuestro caso 10 °C) y de dos etapas, aquél en el que se enfría hasta temperatura ambiente (en nuestro caso 24 °C)

para luego enfriar el producto en la cámara de refrigeración (hasta 10 °C). Es por esto que por cada cultivo se utilizaron los dos sistemas.

Primero se seteó el equipo a la temperatura de enfriamiento más alta (24°C). A medida que el yogur comenzó a circular por el equipo, se le otorgó una pérdida de carga de 2 bar a través de la válvula, para luego proceder con el envasado. Una vez terminado con los prototipos enfriados a 24 °C, el equipo se seteó a 10 °C para luego envasarlos.

3.6. Envasado

Para la etapa de envasado se utilizaron vasos estériles con tapa a rosca descartables, los cuales se colocan bajo flujo laminar y son llenados a través de una manguera, previamente esterilizada en autoclave, la cual comunica con el equipo PTU Scandinox (Figura 32).

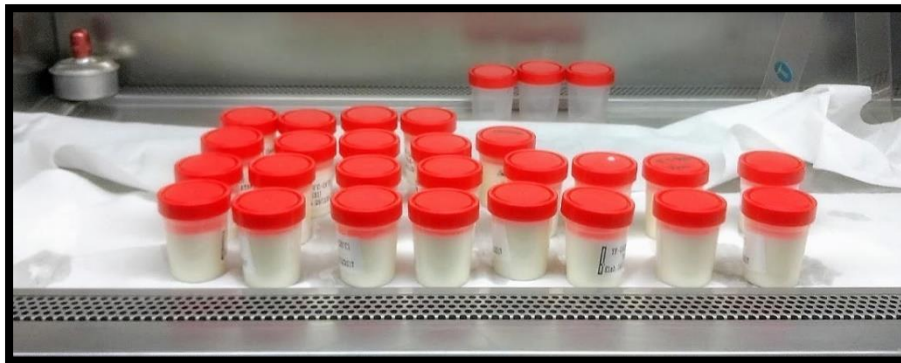


Figura 32. Envasado de los vasos estériles bajo flujo laminar.

Algunos fueron conservados en cámaras frigoríficas a una temperatura de almacenamiento de 10 °C y otros, en estufa, a una temperatura de almacenamiento de 25 °C, debido a que en ciertos países de Latinoamérica no se refrigeran, como por ejemplo en Perú.

3.7. Seguimiento

3.7.1. Post-acidificación

La post-acidificación requiere la mayor cantidad de días de seguimiento debido a su rápida variación durante la vida útil del yogur. En el caso de los yogures enfriados a 10 °C y almacenados a 10 °C se les realizó seguimiento hasta alcanzado dos meses de su elaboración, es decir, se medirá pH en los siguientes días post elaboración: 8 (D+8), 15 (D+15), 22 (D+22), 29 (D+29), 43 (D+43), 57 (D+57). En el segundo mes el seguimiento no se realizó semanalmente, sino bisemanal debido a que la variación de pH no ocurre de manera tan acelerada como en el primer mes de almacenamiento.

Para los yogures enfriados a 24 °C y almacenados, también, a 10°C se procedió de igual forma que en los enfriados a 10 °C.

Para el caso de los prototipos enfriados a 10 °C pero almacenados a 25°C, solamente se les realizó seguimiento en las primeras dos semanas luego de haber sido elaborados, es decir, en los siguientes días: 8 (D+8) y 15 (D+15). Esto se debe a que a esa temperatura de almacenamiento la acidificación es muy acelerada y el desarrollo de microorganismos indeseables (mohos y levaduras) ocurre con facilidad, con lo cual el producto alcanza el fin de su vida útil mucho antes que los prototipos almacenados a 10 °C.

Para los yogures enfriados a 24 °C y almacenados también a 25 °C, se procedió de igual forma que en los enfriados a 10 °C.

El equipo utilizado fue el pHmetro Mettler Toledo (Figura 33).



Figura 33. pHmetro Mettler Toledo.

3.7.2. Reometría

La viscosidad no requiere un seguimiento tan continuado como en el caso de la post acidificación ya que su evolución es más progresiva. En este análisis no se tomaron en cuenta los prototipos almacenados a 25°C debido a que a esa temperatura la estructura se ve afectada por la alta acidez y la actividad proteolítica de los cultivos del producto. Por lo tanto, solo se analizaron los prototipos enfriados tanto a 10 °C como a 24 °C y almacenados a 10°C, teniendo en ambos casos los mismos días de seguimiento, a saber: D+8, D+22 y D+57.

El análisis realizado al yogur bebible en esta investigación fue un test rotacional con shear rate o velocidad de deformación controlada. Se utilizó la estandarización ISO 3219 la cual recomienda medir y comparar valores de shear stress a un definido shear rate, en nuestro caso, 300 [1/segundos]. Ante igual shear rate todas las muestras son medidas bajo las mismas condiciones sin importar la fuerza de su estructura o viscosidad (Wind, 2013).

El equipo utilizado para efectuar el análisis fue el reómetro ANTON PAAR MCR 102 (Figura 34), el cual realiza un análisis de aproximadamente 13 minutos por muestra, previamente enfriada a 13°C a través del baño refrigerante que posee el reómetro. El equipo opera a determinados valores de shear rate o velocidad de deformación ($\dot{\gamma}$), que van en aumento hasta alcanzar 300 [1/segundo] para luego descender la velocidad de deformación hasta el mínimo, aplicando un esfuerzo de corte (τ) distinto según la muestra. El esfuerzo de corte alcanzado al máximo shear rate (300 [1/segundo]) se conoce como shield point y es el que se utiliza para comparar la evolución de la viscosidad de los distintos prototipos.



Figura 34. Reómetro ANTON PAAR MCR 102.

El equipo aporta un gráfico que muestra la evolución del esfuerzo de corte en función del shear rate (Figura 35).

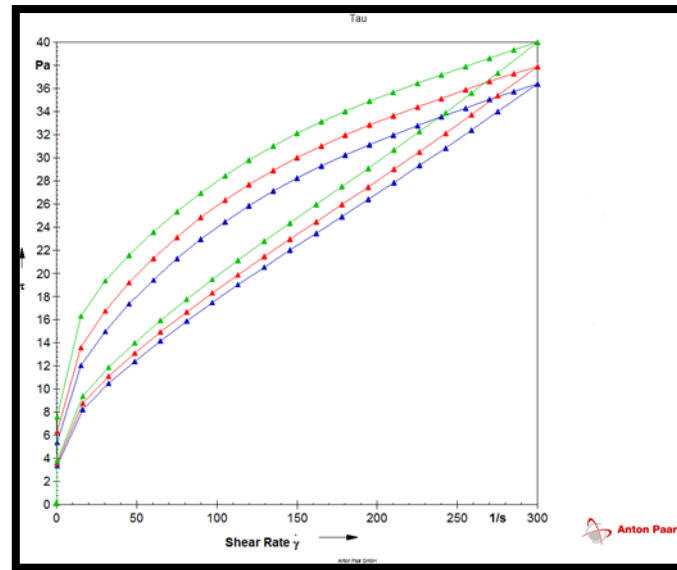


Figura 35. Gráfico aportado por el Reómetro ANTON PAAR MCR 102.

El proceso realizado por este equipo se puede dividir en las siguientes etapas:

I. Pre-shear, en la cual el equipo tiene una velocidad de deformación de 10 [1/segundos] durante 10 segundos. Esta etapa se encuentra presente en yogur bebible.

II. Tiempo de espera, en la cual se reconstruye de alguna forma la estructura original, tiene una duración de 5 minutos.

III. Rampa lineal (distribución uniforme de los puntos), en la cual el equipo aumenta progresivamente de 0 [1/segundos] hasta 300 [1/segundos], trazando el esfuerzo de corte en función de la velocidad de deformación. El shear stress alcanzado a una velocidad de deformación de 300 1/segundos es considerado el parámetro más similar al descriptor sensorial (mouth thickness) (Wind, 2013).

3.7.3. Recuento de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* y *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*

El recuento de bacterias lácteas requirió los mismos días de seguimiento que el análisis de reometría es decir: D+8, D+22 y D+57. Para este parámetro de seguimiento sólo se utilizaron los prototipos enfriados y almacenados a 10 °C.

Se realizó recuento de las bacterias acidolácticas *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* y *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*.

Se efectuaron las diluciones correspondientes en agua peptonada esterilizada al 0,1 %. Las mismas son de 1 mL en 10 mL. Se utilizó el método de siembra en profundidad, sembrando 1 ml de las diluciones correspondientes en las placas de Petri y agregando el medio de cultivo previamente fundido y atemperado a aproximadamente 45 °C.

El método consiste en sembrar un volumen dado de una muestra representativa y homogénea del alimento a analizar y/o diluciones de la misma en placas Petri, utilizando medios de cultivo selectivo y en condiciones de tiempo, temperatura y exigencias de oxígeno apropiados para cada microorganismo:

*Medio MRS acidificado, seguido de una incubación anaeróbica a 37°C ± 1° C por 72 horas para el conteo de **Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus** (APHA 17, 2010).*

Se utilizó el medio de cultivo MRS Difco el cual fue acidificado con ácido acético glacial al 99%, llevando al medio de cultivo a un pH de 5,4 ± 0,1, para mejorar la diferenciación entre **St. salivarius subsp. thermophilus** y **Lb. delbrueckii subsp bulgaricus**. Las placas se colocan en jarras herméticas de anaerobiosis, junto al kit Anaerocult® Merck (Figura 36), el cual contiene un sobre encargado de generar la atmosfera reducida en oxígeno y tiras impregnada con azul de metileno que en ausencia de oxígeno sufren una reacción de cambio de color a blanco (testigo de que la anaerobiosis es correcta). Se lleva a incubación a la temperatura y tiempo indicado en el método.



Figura 36. Placas de Petri con MRS acidificado junto al kit de anaerobiosis.

Por otro lado, para *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* se utiliza el medio de cultivo M-17 Merck, seguido de una incubación aeróbica a $43^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 72 horas. (Chr. Hansen, 2002).

En la Tabla VII puede observarse el resumen con los datos microbiológicos de ambas BAL.

Tabla VII: BAL con sus respectivas características de crecimiento microbiológico.

BAL	Medio de cultivo	Incubación	Temperatura (°C)	Tiempo (horas)	Días de seguimiento
<i>Lb. delbrueeckii subsp bulgaricus</i>	MRS agar (acidificado)	Anaeróbica	37 ± 1	72	8, 22, 57
<i>St. salivarius subsp. thermophilus</i>	M 17 agar	Aeróbica	43 ± 1	72	8, 22, 57

Según el C.A.A. 2014, el recuento de bacterias lácticas totales (UFC/g) en yogur debe ser mínimo de 10^7 , a lo largo de la vida útil.

También se realizó control de mohos y levaduras utilizando el medio YGC agar, coliformes totales utilizando el medio VRB y coliformes fecales utilizando el agar brilla doble concentración (NMP).

3.8. Análisis estadístico

Para conocer el impacto significativo que tuvieron los distintos cultivos en el producto final bajo los mismos parámetros de producción y el impacto significativo que tiene la variación de un determinado parámetro de producción sobre el producto final, realizado a partir del mismo cultivo se llevó a cabo el análisis estadístico ANOVA (Análisis de la varianza) mediante el Software InfoStat desarrollado por la Universidad Nacional de Córdoba. El nivel de significación utilizado fue del 5% ($\alpha < 0,05$) y se analizó mediante el test de comparaciones múltiples de Tukey.

El análisis de la varianza permite probar ciertas hipótesis referidas a los parámetros de posición de dos o más distribuciones. Para ello, se determinaron dos tipos de variables: una respuesta o dependiente y una explicatoria o independiente. La variable dependiente representa la respuesta del sistema que se desea evaluar. Su comportamiento es aleatorio y tiene como fin corroborar si depende de otras variables explicatorias. Por otro lado, la variable independiente es la que interesa examinar si afecta a la variable respuesta y sus valores son controlados por el observador.

Resultados y Discusión

4. Resultados y Discusión.

Cómo se explicó en la sección de Metodología, se aplicó el análisis estadístico ANOVA. En el Anexo A, se muestran los resultados del análisis del cumplimiento de los supuestos necesarios para su aplicación en cada uno de los parámetros estudiados.

En la Tabla VIII se detallan las variables dependientes estudiadas con sus respectivas variables independientes.

Tabla VIII: Variables dependientes estudiadas con sus respectivas variables independientes.

Variable Dependiente	Variables Independientes y Niveles
Acidificación: pH y tiempo (minutos)	Cultivo
pH (Post acidificación)	Temperatura de almacenamiento Temperatura de enfriamiento Cultivo
Reometría	Temperatura de enfriamiento Cultivo
Recuento St./ Lb.	Cultivo

4.1. Cinética de acidificación

Para esta etapa el CINAC Alliance realizó una medición periódica (4 minutos) de pH en los tanques de fermentación, como se aclaró anteriormente. Estos valores fueron registrados en un archivo de Excel, y a partir de los mismos se generó un gráfico que muestra las curvas de acidificación de los distintos cultivos en función del tiempo (minutos) y, a la vez, otro gráfico con la velocidad de acidificación ($\Delta\text{pH}/\text{tiempo minutos}$) en función del tiempo. Todo esto sumado a los datos anteriormente mencionados en la metodología.

En la Figura 37 se muestran los gráficos aportados por el CINAC Alliance para una de las tres elaboraciones realizadas.

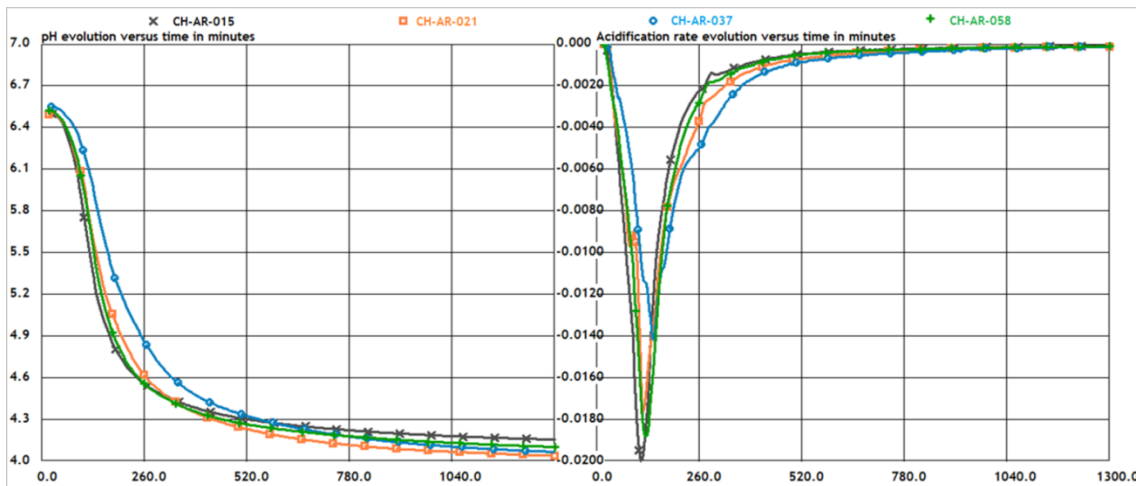


Figura 37. En el gráfico izquierdo se observa la evolución de pH en función del tiempo (minutos) de fermentación. En el gráfico derecho puede verse la velocidad de acidificación ($\Delta\text{pH}/\text{tiempo minutos}$) en función del tiempo.

Se analizaron los feature points mediante InfoStat, utilizando la prueba de ANOVA-Tukey.

En la Figura 38 se incluyen las comparaciones entre los cultivos utilizados en las variables: tiempo de latencia y tiempo hasta pH de corte.

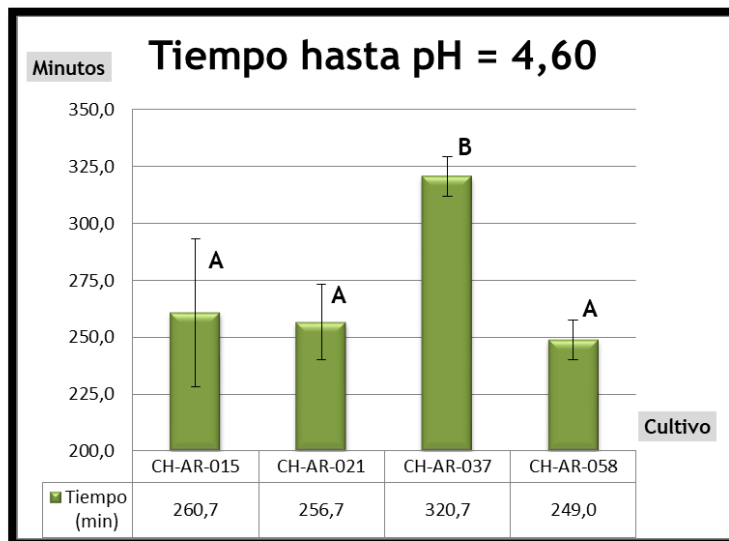
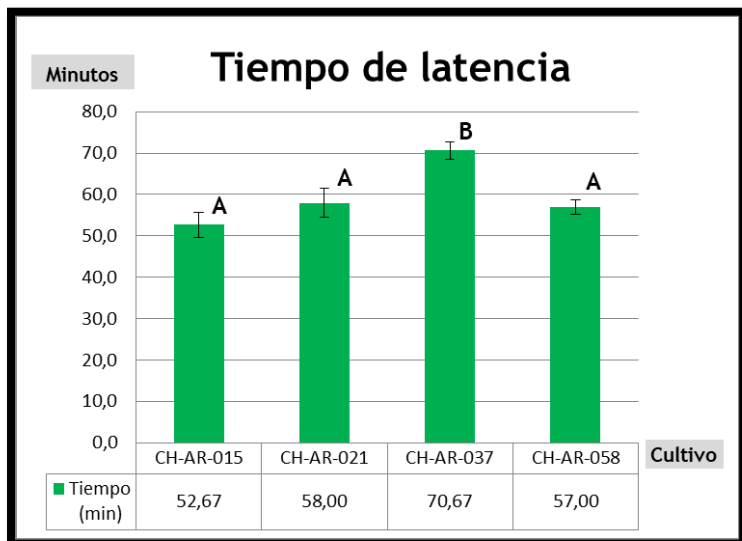


Figura 38. Comparación del comportamiento de la variable en estudio (tiempo de latencia y tiempo hasta pH de corte) entre los distintos cultivos utilizados. Letras distintas significan diferencias significativas ($p < 0,05$).

Se observa que el cultivo CH-AR-037 fue el que presentó mayor tiempo de latencia, diferenciándose significativamente de los otros tres. Esto mismo ocurre con el tiempo hasta llegar a pH de corte.

Con respecto a la variable pH luego de las 20 horas de fermentación, el cultivo que menor valor de pH promedio presentó fue el CH-AR-021, diferenciándose significativamente del CH-AR-015 y CH-AR-058 (Figura 39).

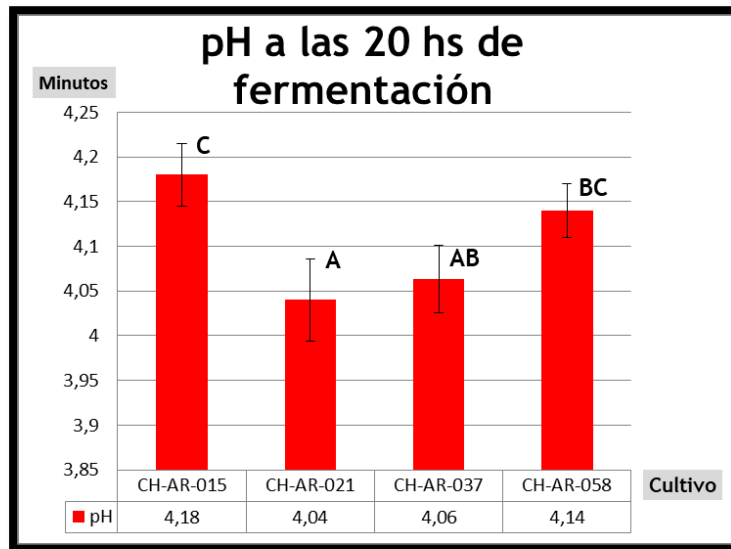


Figura 39. Comparación del comportamiento de la variable en estudio (pH a las 20 hs de fermentación) entre los distintos cultivos utilizados. Letras distintas significan diferencias significativas ($p < 0,05$).

En el caso del tiempo transcurrido entre pH 4,7-4,5, el cultivo que menor tiempo presentó fue el CH-AR-021, diferenciándose significativamente del CH-AR-015 (Figura 40).

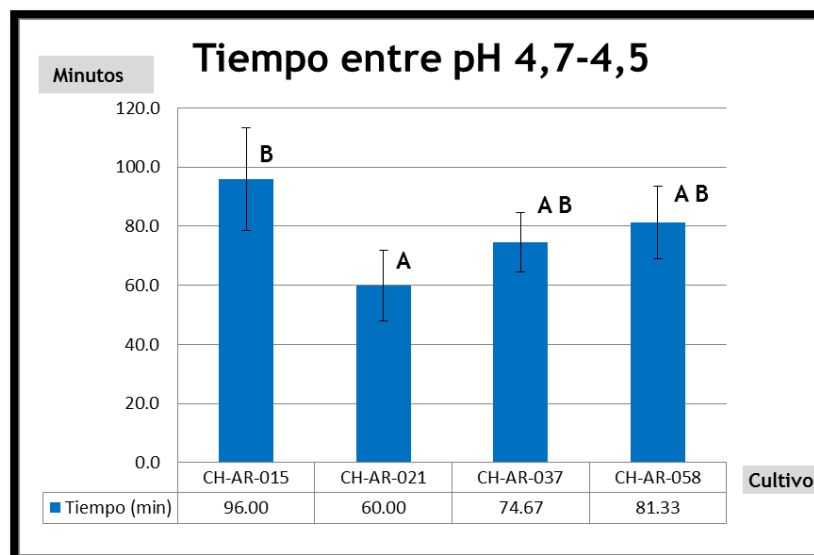


Figura 40. Comparación del comportamiento de la variable en estudio (tiempo entre pH 4,7-4,5) entre los distintos cultivos utilizados. Letras distintas significan diferencias significativas ($p < 0,05$).

El resto del total de los datos aportados por ANOVA (entre ellos el p-valor de cada variable) pueden encontrarse en la sección 7.1.2.

4.2. Post acidificación

Si bien se realizó un seguimiento hasta el D+57 de los prototipos almacenados a 10°C y hasta D+15 de los almacenados a 25°C, para realizar el análisis estadístico se eligió un “D+” en particular. En este caso, la elección fue el D+15 debido a que a los 15 días se considera el fin de vida útil de los prototipos almacenados a 25°C, permitiendo, de esta forma, hacer comparaciones estadísticas con los almacenados a 10°C.

En la Figura 41 se puede observar el pH promedio (triplicado) con sus respectivos desvíos estándar de cada cultivo, que se obtuvo a lo largo de la vida útil, en las cuatro combinaciones posibles de temperatura de enfriamiento y almacenamiento. De los mismos, se seleccionó el D+15 como se mencionó anteriormente los cuales se pueden ver remarcados en los distintos gráficos.

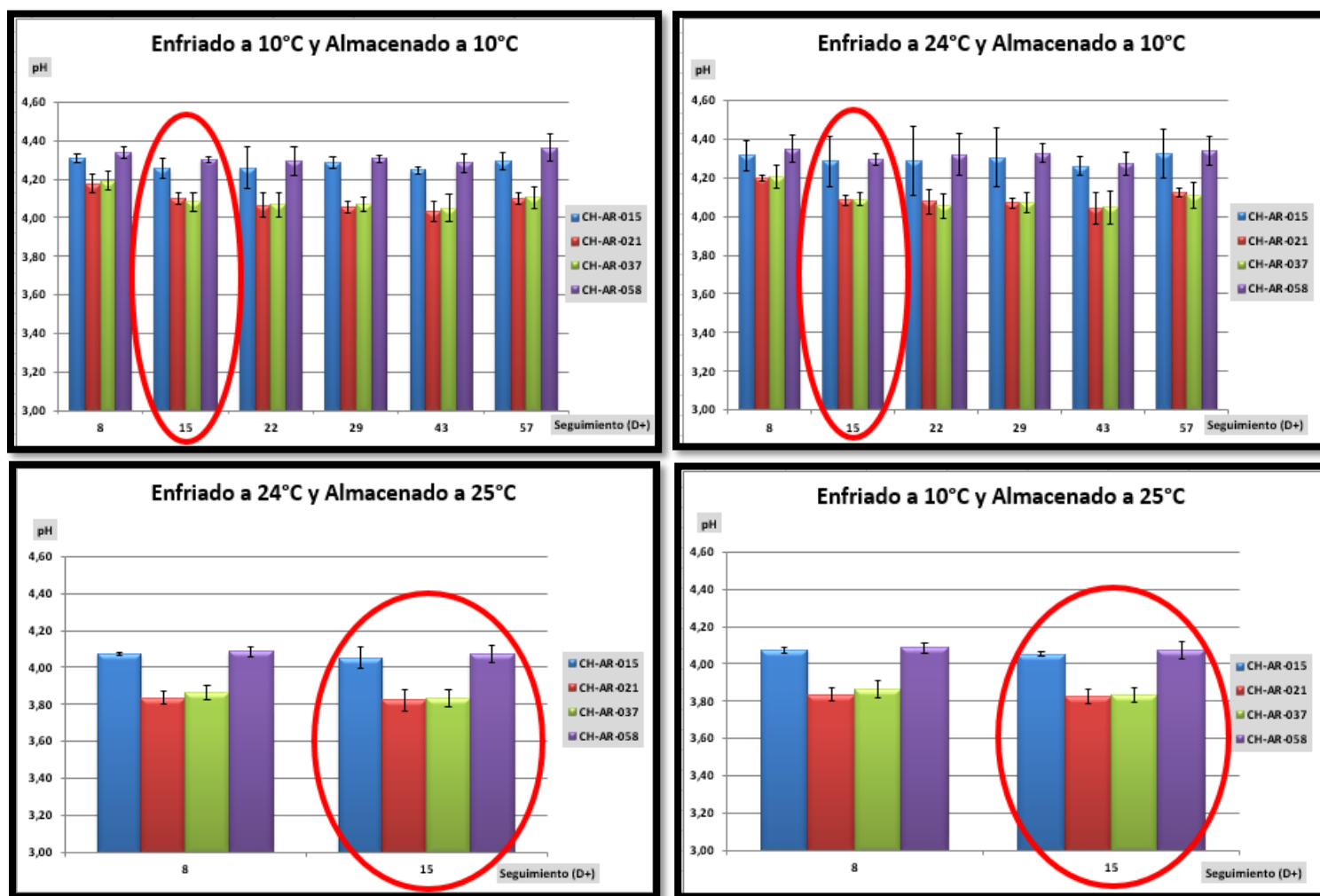


Figura 41. Valores de pH que presentaron los cultivos a lo largo de la vida útil (D+) en las cuatro combinaciones de temperatura posibles.

Observando la Figura 42, la temperatura de enfriamiento utilizada no pareciera tener influencia significativa en el valor de pH en los cultivos, mientras que con la temperatura de almacenamiento no ocurre lo mismo, pudiéndose observar diferencias notorias.

Comparativamente no hubo diferencias significativas con la temperatura de enfriamiento ni con la de almacenamiento, ya que en ambos casos los cultivo CH-AR-015 y CH-AR-058 fueron los menos post-acidificantes. Las diferencias fueron significativas en valor absoluto de pH con las temperaturas de almacenamiento.

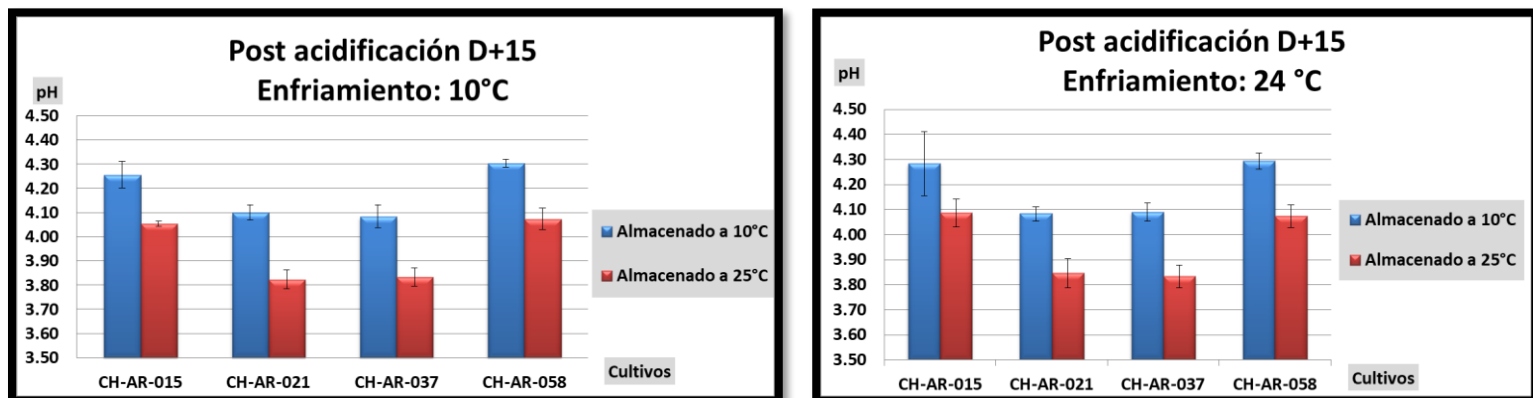


Figura 42. Comparación del comportamiento de la variable en estudio (pH) entre los distintos cultivos utilizados, a ambas temperaturas de almacenamiento y enfriamiento.

Lo anteriormente mencionado, se demostró estadísticamente pudiéndose visualizar los resultados en la Tabla IX.

Tabla IX: Resultados obtenidos mediante el ANOVA-TUKEY para la post acidificación en el D+15.

F.V. *	SC **	gl ***	CM ****	F *****	p-valor
Modelo	1.23	15	0.08	31.61	<0,0001
Cultivo	0.56	3	0.19	72.38	<0,0001
Temp. enfriamiento	7.50E-04	1	7.50E-04	0.29	0.5938
Temp. almacenamiento	0.66	1	0.66	252.99	<0,0001
Cultivo*Temp. enfriamiento	2.10E-03	3	7.00E-04	0.27	0.8474
Cultivo*Temp. almacenamiento	0.01	3	2.10E-03	0.82	0.4926
Temp. enfriamiento*Temp. almacenamiento	4.70E-04	1	4.70E-04	0.18	0.6735
Cultivo*Temp. enfriamiento*Temp. almacenamiento	8.70E-04	3	2.90E-04	0.11	0.9523
Error	8.00E-02	32	2.60E-03		
Total	1.31E+00	47			

* F.V.: Fuente de variación.

** SC: Suma de Cuadrados.

*** gl: Grados de libertad.

**** CM: Cuadrados Medios.

***** F: Estadístico F.

Se observa en la Tabla X, que la temperatura de enfriamiento no presentó diferencias significativas al igual que las diferentes interacciones posibles, mientras que el cultivo y la temperatura de almacenamiento sí presentaron diferencias significativas. Por lo tanto, existen evidencias suficientes para afirmar que al menos un

cultivo y la temperatura de almacenamiento difirieron en cuanto al valor de pH promedio, es decir que alguno de los cultivos y la temperatura de almacenamiento utilizada exhibieron un valor de pH estadísticamente diferente.

Como el pH no fue dependiente de la temperatura de enfriamiento, se unificaron estos valores, por lo tanto, se muestra un gráfico de barras en el que están representadas únicamente las temperaturas de almacenamiento utilizadas (Figura 43).

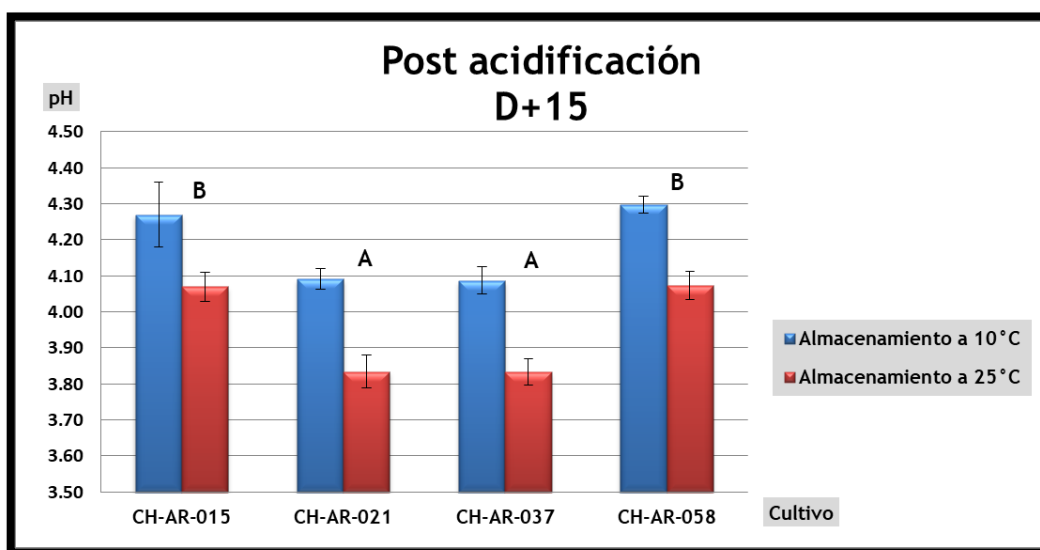


Figura 43. Comparación del comportamiento de la variable en estudio (pH) entre los distintos cultivos utilizados, a ambas temperaturas de almacenamiento.

A la vez, como la interacción entre el cultivo y la temperatura de almacenamiento no fue significativa, la variación de la temperatura de almacenamiento afectará de igual forma los valores de pH, independientemente del cultivo utilizado. Esto permite unificar también los valores de pH a distinta temperatura de almacenamiento, resultando así un total de doce muestras por cada cultivo. Estos resultados pueden ser visualizados en la Tabla X.

Tabla X: Valor de pH de cada cultivo utilizado, al realizar las unificaciones correspondientes. Se incluye, en cada caso, la media \pm el desvío estándar y la letra asignada por la prueba. Letras distintas significan diferencias significativas ($p < 0,05$).

Cultivo	Valor de pH
CH-AR-015	4,17 \pm 0,12 (B)
CH-AR-021	3,96 \pm 0,14 (A)
CH-AR-037	3,96 \pm 0,14 (A)
CH-AR-058	4,19 \pm 0,12 (B)

Pudo observarse que el par de cultivos CH-AR-015 y CH-AR-058 presentó significativamente menor post acidificación, con un valor de pH de 4,17 y 4,19 respectivamente, que el par CH-AR-021 y CH-AR-037, con un valor de pH de 3,96 en ambos casos.

A modo de resumen: se pudo comprobar que la temperatura de enfriamiento no influye significativamente en el pH del producto final durante su post acidificación a los 15 días de vida útil. Lo opuesto ocurrió con la temperatura de almacenamiento, la cual sí afectó el pH, siendo significativa esa diferencia en los cuatro cultivos utilizados.

Al no existir interacciones entre el cultivo y estas dos temperaturas, se pudo unificar las cuatro combinaciones que existían dentro de un mismo cultivo, independizándose de los parámetros de producción elegidos, existiendo así doce muestras por cultivo. Una vez realizado esto, se pudo comparar cómo afectan o no significativamente los cultivos al yogur en el pH.

4.3. Reometría

Si bien se realizó un seguimiento hasta el D+57 al igual que en la post acidificación, en este caso se seleccionó para el análisis el D+22.

En la Figura 44 se puede observar el shear stress promedio (triplicado) de cada cultivo que se obtuvo a lo largo de la vida útil, en las dos combinaciones posibles de temperatura de enfriamiento. Este parámetro se mantuvo estable durante la vida útil en

todos los cultivos. De los mismos, se seleccionó el D+22 como se mencionó anteriormente los cuales se pueden ver remarcados en los distintos gráficos.

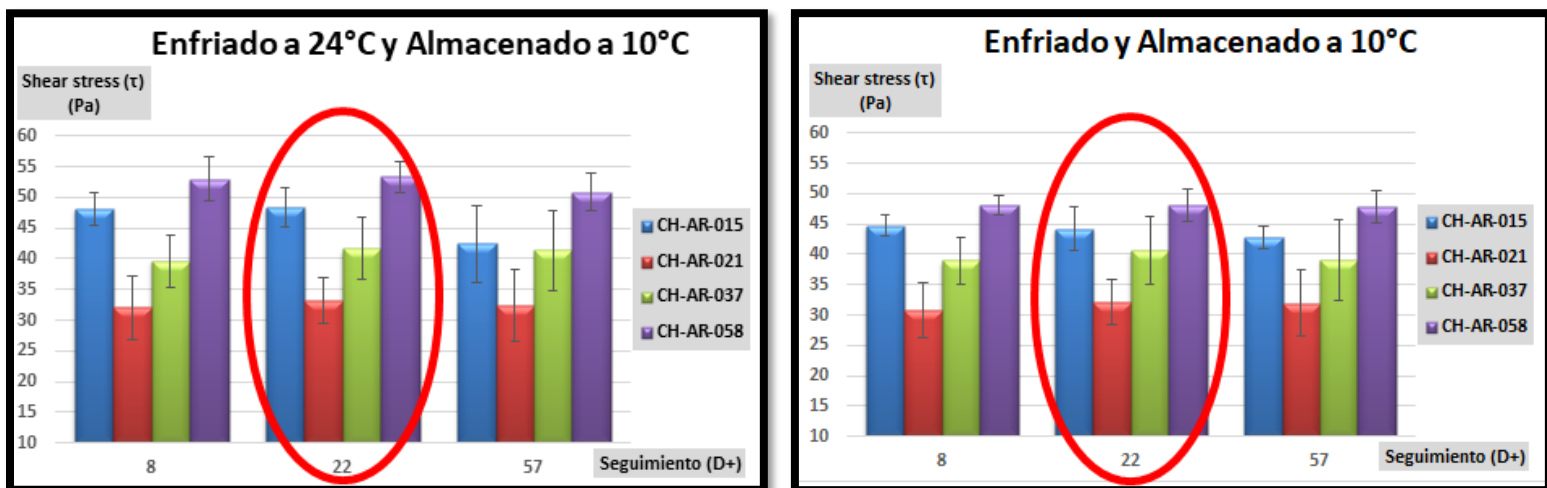


Figura 44. Valores de shear stress que presentaron los cultivos a lo largo de la vida útil.

Observando la Figura 45, la temperatura de enfriamiento utilizada pareciera tener influencia significativa en el valor de shear stress en el cultivo CH-AR-058.

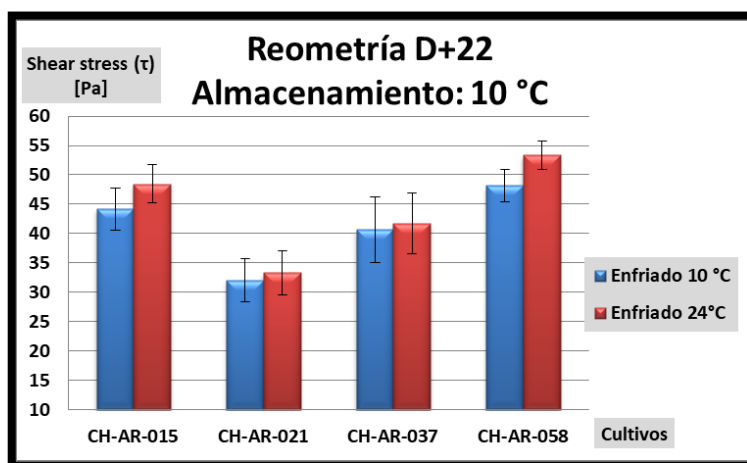


Figura 45. Comparación del comportamiento de la variable en estudio (shear stress) entre los distintos cultivos utilizados, a ambas temperaturas de enfriamiento.

Lo anteriormente mencionado, se demostró estadísticamente pudiéndose visualizar los resultados en la Tabla XI.

Tabla XI: Resultados obtenidos mediante el ANOVA-TUKEY para la reometría en el D+22.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1150.7	7	164.39	10.78	0.0001
Cultivo	1080.23	3	360.08	23.6	<0,0001
Temp. enfriamiento	50.69	1	50.69	3.32	0.0871
Cultivo*Temp. Enfriamiento	19.78	3	6.59	0.43	0.7328
Error	244.08	16	15.25		
Total	1394.78	23			

Se observa en la Tabla XI que el shear stress no fue dependiente de la temperatura de enfriamiento, al igual que ocurrió con la interacción entre el cultivo y la temperatura de enfriamiento, mientras que el cultivo sí presentó diferencias significativas. Existen evidencias suficientes para afirmar que al menos un cultivo difirió en cuanto al valor de shear stress promedio, es decir que alguno de los cultivos exhibió un valor de shear stress estadísticamente diferente.

Como la reometría no es dependiente de la temperatura de enfriamiento y tampoco existe interacción significativa entre este parámetro y el cultivo, se unifican estos valores, independizándose de la temperatura, existiendo así seis muestras por cultivo. Una vez realizado esto, se pudo comparar cómo afectan o no significativamente los cultivos al yogur en el shear stress. Estos resultados aportados por el programa pueden ser observados en la Tabla XII.

Tabla XII: Valor de shear stress de cada cultivo utilizado, al realizar las unificaciones correspondientes. Se incluye, en cada caso, la media \pm el desvío estándar y la letra asignada por la prueba. Letras distintas significan diferencias significativas ($p < 0,05$).

Cultivo	Valor Shear Stress (τ)
CH-AR-015	46,32 \pm 3,83 (BC)
CH-AR-021	32,7 \pm 3,37 (A)
CH-AR-037	41,19 \pm 4,86 (B)
CH-AR-058	50,74 \pm 3,64 (C)

Se observa que el cultivo CH-AR-058 presenta el mayor shear stress y difiere de manera significativa del CH-AR-021 y CH-AR-037.

El cultivo con menor shear stress promedio fue el CH-AR-021, con un valor de 32,7 a diferencia del CH-AR-058 que tuvo el mayor shear stress promedio, con un valor de 50,74.

4.4. Recuento de *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*

Se realizó un seguimiento a lo largo de la vida útil tomando tres puntos de la misma. En la Tabla XIII se puede ver la evolución de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* y *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*.

Tabla XIII: Evolución del recuento de ambas cepas a lo largo de la vida útil con sus respectivos desvíos estándar.

Cultivos	BAL	D+8 *	D+22 *	D+57 *
CH-AR-015	ST	8.54 ± 0.19	8.55 ± 0.20	7.89 ± 0.65
	Lb	4.94 ± 1.04	4.64 ± 1.34	4.05 ± 0.65
CH-AR-021	ST	8.17 ± 0.47	8.11 ± 0.30	7.13 ± 0.58
	Lb	5.08 ± 0.13	5.05 ± 0.04	1.08 ± 0.34
CH-AR-037	ST	8.24 ± 0.09	8.37 ± 0.18	7.10 ± 0.49
	Lb	4.72 ± 0.19	4.26 ± 0.70	1.43 ± 0.38
CH-AR-058	ST	8.54 ± 0.14	8.38 ± 0.02	7.92 ± 0.23
	Lb	5.25 ± 0.67	5.76 ± 0.74	4.49 ± 0.27

* Promedio del triplicado y desvíos estándar. Resultados expresados en Log₁₀.

Se observó que hasta el D+22, en ambas cepas, el recuento se mantuvo relativamente estable en los cuatro cultivos, pero se refleja un marcado descenso al fin de vida útil sobre todo en los cultivos CH-AR-021 y CH-AR-037.

Este marcado descenso se dio en mayor medida en *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. En el estudio realizado por Reinheimer *et al* 2000, se reveló que el recuento de *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* en todos los tipos de yogur estudiados fue mayor que el de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, pudiendo ser debido al uso de estárter con composición predominante de *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*, lo cual es muy común en los mercados locales. Los

cultivos de este tipo permiten una producción de yogur con reducida acidez y menor riesgo de post acidificación. Además, la alta concentración de azúcar, pudo haber afectado la viabilidad de los bacilos.

Estos resultados también coinciden con las investigaciones realizadas por Rajiv (1998) y por Yilmaz-Ersan y Kurdal (2014). No coincide con lo expuesto por Perales (2010), suponemos que es debido a que se trata de un cultivo mixto no comercial realizado en laboratorio, el cual creemos que debe estar conformado por cepas de *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* más productoras de ácido láctico y a la vez más resistentes a la acidez y por cepas de *St. salivarius subsp. thermophilus* más débiles.

Cabe destacar, que si bien *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* es el principal productor de ácido láctico, es el menos resistente a la acidez durante la vida útil.

Se optó por el D+57 para el análisis estadístico de manera de corroborar que todos los cultivos estudiados lleguen al fin de su vida útil con la cantidad de BAL exigida por el C.A.A.

Todos los cultivos cumplieron con la cantidad y género de bacterias ácido lácticas exigidos por el Código Alimentario Argentino, al fin de su vida útil.

En el caso del *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*, no se observaron diferencias significativas entre los cultivos. Existen evidencias suficientes para afirmar que el valor de recuento promedio de los cultivos es el mismo. Esto puede ser observado en la Tabla XIV.

Tabla XIV: Resultados obtenidos mediante el método ANOVA para el recuento de *St. salivarius subsp. thermophilus* en el D+57.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1,88	3	0,63	2,37	0,1462
Cultivo	1,88	3	0,63	2,37	0,1462
Error	2,11	8	0,26		
Total	3,99	11			

Para el caso del *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* se observaron diferencias significativas entre los cultivos. Existen evidencias suficientes para afirmar

que al menos un cultivo difiere del resto en cuanto el valor de recuento promedio de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. Esto puede ser observado en la Tabla XV.

Tabla XV: Resultados obtenidos mediante el método ANOVA para el recuento de *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* en el D+57.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	27,73	3	9,24	48,70	<0,0001
Cultivo	27,73	3	9,24	48,70	<0,0001
Error	1,52	8	0,19		
Total	29,25	11			

Para conocer cuáles fueron los cultivos que difirieron en cuanto al valor promedio de recuento, se realizó el test de Tukey obteniéndose los resultados presentes en la Figura 46.

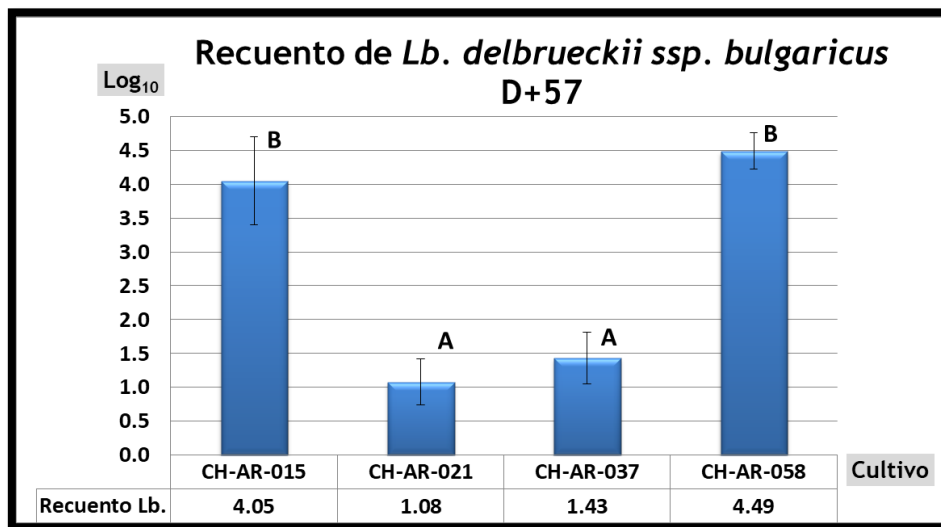


Figura 46. Comparación del comportamiento de la variable en estudio (*Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus*) entre los distintos cultivos utilizados con sus respectivas letras. Letras distintas significan diferencias significativas ($p < 0,05$).

Se observa que el cultivo CH-AR-058 presenta el mayor recuento y difiere de manera significativa del CH-AR-021 y CH-AR-037.

El cultivo con menor recuento promedio fue el CH-AR-021, con un valor de 1,08 \log_{10} ufc/g a diferencia del CH-AR-058 que tuvo el mayor recuento promedio, con un valor de 4,49 \log_{10} ufc/g.

CONCLUSIONES

5. Conclusiones

Este trabajo de investigación demostró la influencia que tiene el cultivo de bacterias lácticas sobre el yogur bebible, ante idénticos parámetros de producción, tanto en su elaboración (fermentación), como en el producto final (seguimiento a lo largo de la vida útil).

En los cultivos estudiados, los resultados demostraron que el pH luego de las 20 horas de fermentación es un parámetro que correlaciona muy bien con la post acidificación del producto.

Asimismo, se comprobó que los cultivos impactan significativamente tanto en la post acidificación como en la reometría ($p\text{-value} < 0,0001$; en ambos parámetros).

Los cultivos utilizados mostraron reometría estable hasta fin de vida útil. Según Damini *et al*, 2007 existen cultivos que varían la reometría, originando productos muy variables en el mercado, los cuales no son buscados.

Puede afirmarse que los cultivos, manteniendo idéntica base y parámetros de producción, impactaron significativamente en: feature points, post acidificación, reometría y recuento BAL, exceptuando el recuento de *St. salivarius ssp. thermophilus*.

Los cultivos con menor recuento de *Lb. delbrueckii subsp bulgaricus* y *St. salivarius ssp. thermophilus* a fin de vida útil, fueron los que presentaron mayor post acidificación.

Si bien todos los cultivos analizados resultaron estables en su post acidificación y reometría a lo largo de la vida útil, se destacan CH-AR-015 y CH-AR-058, ya que presentan menor post acidificación y mayor shear stress. Este perfil de producto es el mayormente buscado por el consumidor.

Por otra parte, se demostraron las interacciones existentes entre los parámetros de proceso y los del producto final.

La variación de la temperatura de enfriamiento, tanto en la post acidificación como en la reometría, no generó diferencias significativas en los cultivos analizados. La justificación con respecto a la post acidificación puede residir, por un lado en la robustez de los cultivos, y por otro, en el corto tiempo en que los cultivos permanecen a mayor temperatura (24°C) debido a que los envases son de pequeño tamaño (150 ml)

y son llevados a la cámara de refrigeración prontamente luego de su envasado. En la reometría, debe destacarse que el enfriamiento ocurrió previo a la aplicación de la contrapresión y, cuanto menor sea esta temperatura, mayor será el stress mecánico en el producto final, dañándose en mayor medida la estructura. Esto vuelve a demostrar la robustez de los cultivos frente a la variación de un parámetro de producción, siendo así más importante la buena elección de un cultivo independientemente de la temperatura de enfriamiento utilizada.

La post acidificación fue influenciada significativamente por la variación de la temperatura de almacenamiento ($p\text{-value} < 0,0001$). Esto puede deberse a la aceleración de las reacciones biológicas que tienen lugar en el producto, las cuales son el resultado de la actividad metabólica de las cepas que componen el cultivo. El resultado es de alta relevancia debido a que en ciertos países de Latinoamérica el yogur no se almacena en condiciones óptimas de refrigeración, generando que el producto se desvíe del perfil de acidez deseado por el consumidor.

Conocer la interacción de los cultivos con los parámetros de producción, brinda una importante información a la industria láctea facilitándole así a los fabricantes de yogur la elección del cultivo en función de las características de su proceso.

Este trabajo puede servir como puntapié inicial para una investigación aún más amplia, incluyendo una mayor variedad de cultivos y parámetros de producción (por ejemplo: variación de contrapresión, temperatura de fermentación, ingredientes de la formulación, entre otros).

BIBLIOGRAFÍA

6. Bibliografía

- Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (A.N.M.A.T.). C.A.A., Capítulo VIII: Alimentos lácteos [en línea]. 2014. [consulta 23 may 2017].
 < http://www.anmat.gov.ar/alimentos/normativas_alimentos_caa.asp >.
- ALEM, Pablo. *Tendencias e innovaciones en el desarrollo de productos lácteos*. Chr. Hansen, 2015.
- ASWAL, Priyanka, *et al.* 2012. *Yoghurt: preparation, characteristics and recent advancements*. Cibtech Journal of Bio-Protocols [en línea]. 2012 Vol. 1 (2) September- December. [consulta 22 dic. 2017].
 <<http://www.cibtech.org/J-Bio-Protocols/PUBLICATIONS/2012/Vol-1-No-2/05-002...Priyadarshani...Yoghurt...Review.pdf>>. ISSN: 2319–3840>.
- BALZARINI, M.G. *et al.* *Manual del Usuario. InfoStat – Software estadístico*. Córdoba: Editorial Brujas, 2008. 336 p.
- BEAL, Catherine, *et al.* 1999. *Combined Effects of Culture Conditions and Storage Time on acidification and Viscosity of Stirred Yogurt*. Journal of Dairy Science. Vol. 82, No. 4, April 1999, pp. 676-679. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(99)75283-5.
- BIANCHI B. y SALVADORI. *Lactic acid bacteria: biochemical characteristics affecting the texture of fermented milk products*. International Dairy Federation. 1997.
- CHANDAN, Ramesh C., *et al.* *Dairy Processing & Quality Assurance*. John Wiley & Sons, 2008. Capítulo 10, Cultured Milk and Yogurt, p. 219-229. ISBN: 978-0-813-82756-8.
- CHO Y.H., *et al.* *Rheological properties of acid milk gels as affected by the nature of the fat globule surface material and heat treatment of milk*. Volume 9, Issue 8, 1999. Int. Dairy J. 1999;9:537–545. doi: 10.1016/S0958-6946(99)00123-5.
- DAMIN, María Regina, *et al.* 2008. *Effect of cold storage on culture viability and some rheological properties of fermented milk prepared with*

yogurt and probiotic bacteria. Journal of Texture Studies. February 2008, pp. 41-49. DOI: 10.1111/j.1745-4603.2007.00129.x.

- DESMAZEAUD, Michel. *Rol de las bacterias lácticas durante la fabricación y maduración de quesos y en la elaboración de yogurt*. Buenos Aires: INTI, 1990. 1 v. Publicación.
- DI RIENZO, J.A. *et al. InfoStat – Software Estadístico [software]*. Córdoba: Grupo InfoStat, 2008. Disponible en: <http://www.infostat.com.ar/index.php?mod=page&id=46>.
- ENCISO MARTÍNEZ, Carla María. ALSEC. *Yogur: un alimento nutritivo y versátil* [en línea]. 2016, boletín No. 18. [consulta 10 jun. 2017] < https://issuu.com/alsec_sas/docs/boletin_n_18_yogur>.
- EUROMONITOR INTERNATIONAL. 2016. [consulta 21 may 2017]. < <http://www.euromonitor.com/>>.
- FERRARI COSTA, Alejandro. 2015. Tecnología de los alimentos II.
- GARIBAY, Mariano García, *et al. Biotecnología alimentaria*. 1993. México, D.F. Editorial Limusa. ISBN: 968-18-4522-6.
- GEANKOPLIS, Christie John. *Procesos de transporte y operaciones unitarias*. 3a ed. México, D.F.: CECSA, 1998. 1007 p. Capítulo 4, Principios de transferencia de calor en estado estacionario, p. 301-310. ISBN 9789682613166.
- GONÇALVEZ, Denisse, *et al. Effect of thickeners on the texture of stirred yogurt*. Alim. Nutr. Araraquara, v.16, n.3, p. 207-211, jul./set. 2005. ISSN 0103-4235.
- GOSTA BYLUND, M. *Dairy processing handbook*. Suecia: Teknotext AB, 1995.
- HAQUE, A., *et al. Effect of fermentation temperature on the rheology of set and stirred yogurt*. Food Hydrocolloids 15 (2001) 593 602. 2001.
- HARRIS, Elsa Mohino, *et al.* 2016. *Fluido no newtoniano*. [consulta 11 ene. 2018]. < <https://www.ucm.es/data/cont/docs/76-2015-03-19-Fluido%20no%20newtoniano.pdf>>.

- HARTE, F. *et al*, 2007. *Yield stress for initial firmness determination on yogurt*. Journal of Food Engineering, June 2007 DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2006.06.027.
- HOSSAIN, Nushrat. *Development of improved quality yogurt in terms of texture, flavor, food value and low cost*. 2015.
- Instituto de Salud Pública. *Procedimiento recuento de Lactobacillus bulgaricus y Streptococcus thermophilus en yogurt* [en línea]. APHA 17. 2010. [consulta 4 jul. 2017] <http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento_tecnico/2011/01/PRT-712.02-047%20V2%20Lactobac%20y%20Strept%20yogurt.pdf>.
- KEOGH, M. K. y O’KENNEDY, B.T. *Rheology of Stirred Yogurt as Affected by Added Milk Fat, Protein and Hydrocolloids*. Journal of food science, Vol. 63, No. 1, 1998. pp. 109-111.
- KESSLER, H.G. *The structure of fermented milk products as influenced by technology and composition*. Texture of fermented milk products & dairy desserts. Institute for Dairy Science and Food Process Engineering. 1997.
- LAVEZZARI D., *et al* 1997. *Microorganisms producing polysaccharides: differentiation between ropy and thickening strains*. Texture of fermented milk products & dairy desserts.
- LEE, W.J. y LUCEY, J.A. *Formation and Physical Properties of Yogurt*. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences. Vol. 23, No. 9, 2010. DOI: 10.5713/ajas.2010.r.05.
- MADEIROS, A. C., *et al* 2015. *Effect of incubation temperature, heat treatment and milk source on the yoghurt kinetic acidification*. International Food Research Journal 22(3): 1030-1036 (2015).
- MARAFON, A. P. *et al* 2011. *Effects of partially replacing skimmed milk powder with dairy ingredients on rheological, sensory profiling, and microstructure of probiotic stirred-type yogurt during cold storage*. Journal of Dairy Science, November 2011, pp. 6-10.
- MARSGALL, Valerie M. y RAWSON, H. L. *Effects of exopolysaccharide-producing strains of thermophilic lactic acid bacteria on*

the texture of stirred yogurt. International Journal of Food Science & Technology, Volume 34, April 1999. DOI: 10.1046/j.1365-2621.1999.00245.x.

- PERALES, David. *El yogur, un ejemplo de cooperación entre bacterias* [en línea]. La ciencia de la vida, la biología UV. Octubre 22nd, 2010. [consulta 15 jun. 2017]. < <http://tapeda.blogs.uv.es/2010/10/22/el-yogur-un-ejemplo-de-cooperacin-entre-bacterias/> >.
- RAJIV, I. Dave. 1998. *Factors affecting viability of yoghurt and probiotic bacteria in commercial starter cultures*.
- RAMIREZ, José Carmen, et al. *Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud*. Revista Fuente Año 2, No 7, abril-junio 2011. ISSN 2007-0713.
- REECE, Jane B, et al. *Campbell biology*. 10th ed. Boston: Pearson, 2014. 1480 p. ISBN 9780321775658.
- REINHEIMER, J.A., et al. *Viability of lactic acid microflora in different types of yoghurt*, 2000. Food Research International 33 (2000) 799-805.
- ROMERO DEL CASTILLO SHELLY, Roser y LAGARRIGA Josep. *Productos lácteos: tecnología*, 2004. EDICIONES UPC. Capítulo 6, Leches Fermentadas, p. 125. ISBN: 9788483017456.
- SCARAMAL, L., 2010. *Bioquímica de los Alimentos*. Ciudad de Buenos Aires: en prensa.
- SCHALLER, Aníbal. Portal Lechero. *Yogur y leche cultivada- Perfiles productivos* [en línea]. 2008. [consulta 20 abr. 2017]. <<https://www.portalechero.com/innovaportal/v/3379/1/innova.front/yogur-y-leche-cultivada---perfiles-productivos.html>>.
- SEBASTIANI H., et al 1997. *Cultures for the improvement of texture in quarg*.
- SFAKIANAKIS, Panagiotis y TZIA, Constatnina. *Conventional and Innovative Processing of Milk for Yogurt Manufacture; Development of Texture and Flavor: A Review*. Foods, 2014, pp. 176-182. doi:10.3390/foods3010176.

- SODINI, I., *et al.* *Effect of milk base and starter culture on acidification, texture, and probiotic cell counts in fermented milk processing.* Journal of dairy science, 2002 Oct;85(10):2479-88.
- Subsecretaría de Lechería de Argentina-Ministerio de Agroindustria. 2017. [consulta 10 dic 2017]. <https://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/ss_lecheria/>.
- TABOADA, Graciela. *Revolucionario cultivo láctico para la elaboración de yogures.* *Tecnología Láctea Latinoamericana* N° 91. 2014. p. 15-16.
- TAMILLOW, Kay. *América Economía.* 28 de Noviembre de 2012. *El boom del consumo de yogurt en Latinoamérica.* [Artículo en línea]. Disponible en: <https://www.americaeconomia.com/analisis-opinion/el-boom-del-consumo-de-yogurt-en-latinoamerica> .
- TAMIME, A.Y y DEETH, H.C. *Yogurt: Technology and Biochemistry.* Journal of Food Protection, Vol. 43, No.12. Pages 939-977, 1980.
- TAMIME, A.Y y ROBINSON, R.K. *Yogur: ciencia y tecnología.* Zaragoza: Acribia, 1991. 368 p. ISBN 9788420006871.
- Technical Bulletin Chr. Hansen. *Method for counting Streptococcus thermophiles in Yoghurt-F-7.* 2002.
- TEGGATZ, J. A. y MORRIS, H.A. 1990. *Changes in the Rheology and Microstructure of Ropy Yogurt During Shearing.* Food Structure, Vol. 9: No. 2, Article 9. Disponible en: <http://digitalcommons.usu.edu/foodmicrostructure/vol9/iss2/9>.
- WALSTRA, Pieter, *et al.* *Dairy Science and Technology.* 2a. ed. Boca Ratón, Florida: Taylor & Francis Group, 2006. ISBN 0-8247-2763-0.
- WEILL, Ricardo. *El Yogur: un alimento milenario a la luz del siglo XXI.* 1ª edición, Buenos Aires: Asociación Civil Danone para la Nutrición, la Salud y la Calidad de Vida, 2017. Capítulo 2, El yogur en la historia del hombre, p. 40-41. ISBN: 978-987-28033-4-6
- WELER, Victoria. Food News Latam. *Se espera que el Mercado de yogures bebibles crezca un 8% cada año* [en línea]. 2016. [consulta 22 nov.

2017]. . <http://www.foodnewslatam.com/sectores/6301-se-espera-que-el-mercado-de-yogures-bebibles-crezca-un-8-cada-a%C3%B1o.html?utm_source=FoodNewsLatam.com&utm_campaign=f7281b5474-FNL+Newsletter+week+45+%28Fri+11+November+2016%29&utm_medium=email&utm_term=0_6f3afcf81d-f7281b5474-%5BLIST_EMAIL_ID%5D&ct=t%28FNL+Newsletter+week+45+%28Fri+11+November+2016%29%29&mc_cid=f7281b5474&mc_eid=%5BUNIQID%5D>.

- WIND, Sandra Lykke. 2010. *Introduction to rheology and texture methods in Chr. Hansen*.
- WU, Sha, *et al.* *Effects of Incubation Temperature, Starter Culture Level and Total Solids Content on the Rheological Properties of Yogurt*. International Journal of Food Engineering: Vol. 5: Iss. 2, Article 3, 2009. DOI: 10.2202/1556-3758.1436.
- YILDIZ, Fatih. *Development and Manufacture of Yogurt and Other Functional Dairy Products*. Boca Ratón, Florida: Taylor & Francis Group, 2010. ISBN: 978-1-4200-8207-4.
- YILMAZ, L. y KURDAL E. *The production of set-type-bio-yoghurt with comercial probiotic culture*. International Journal of Chemical Engineering and Applications, Vol. 5, No. 5, October 2014, pp. 404-405. DOI: 10.7763/IJCEA.2014.V5.418.

ANEXO

7. Anexo

7.1. Anexo A: Análisis Estadístico

7.1.1. Supuestos ANOVA

Para el análisis estadístico de los datos se empleó el software Infostat (FCA, Universidad Nacional de Córdoba). Se procedió a realizar la prueba estadística ANOVA (Análisis de la Varianza).

Para poder aplicar dicha prueba, se debieron cumplir los siguientes supuestos:

- ✓ Las observaciones en cada tratamiento deben proceder de poblaciones normales.
- ✓ Los tratamientos deben tener la misma variabilidad σ (homocedasticidad).
- ✓ Las muestras deben ser aleatorias y las observaciones independientes entre sí.

La prueba de ANOVA cuenta con dos hipótesis: una nula y otra alternativa. La hipótesis nula es aquella construida para anular o refutar, presumiéndosela verdadera hasta que la prueba estadística indique lo contrario. La hipótesis alternativa es aquella que resulta verdadera por el rechazo de la hipótesis nula. Para determinar si la hipótesis nula era o no rechazada, se estableció un nivel de significación o nivel de confianza del 5% ($\alpha < 0,05$).

7.1.1.1. Normalidad

Para verificar el principio de normalidad se procedió a realizar el método gráfico y analítico.

La manera gráfica consiste en construir un Q-Q plot normal. Mediante esta técnica se obtiene un diagrama de dispersión de los residuos obtenidos versus los cuantiles teóricos de una distribución normal. Si los residuos son normales y no hay otros defectos del modelo, se alinearán sobre una recta a 45°.

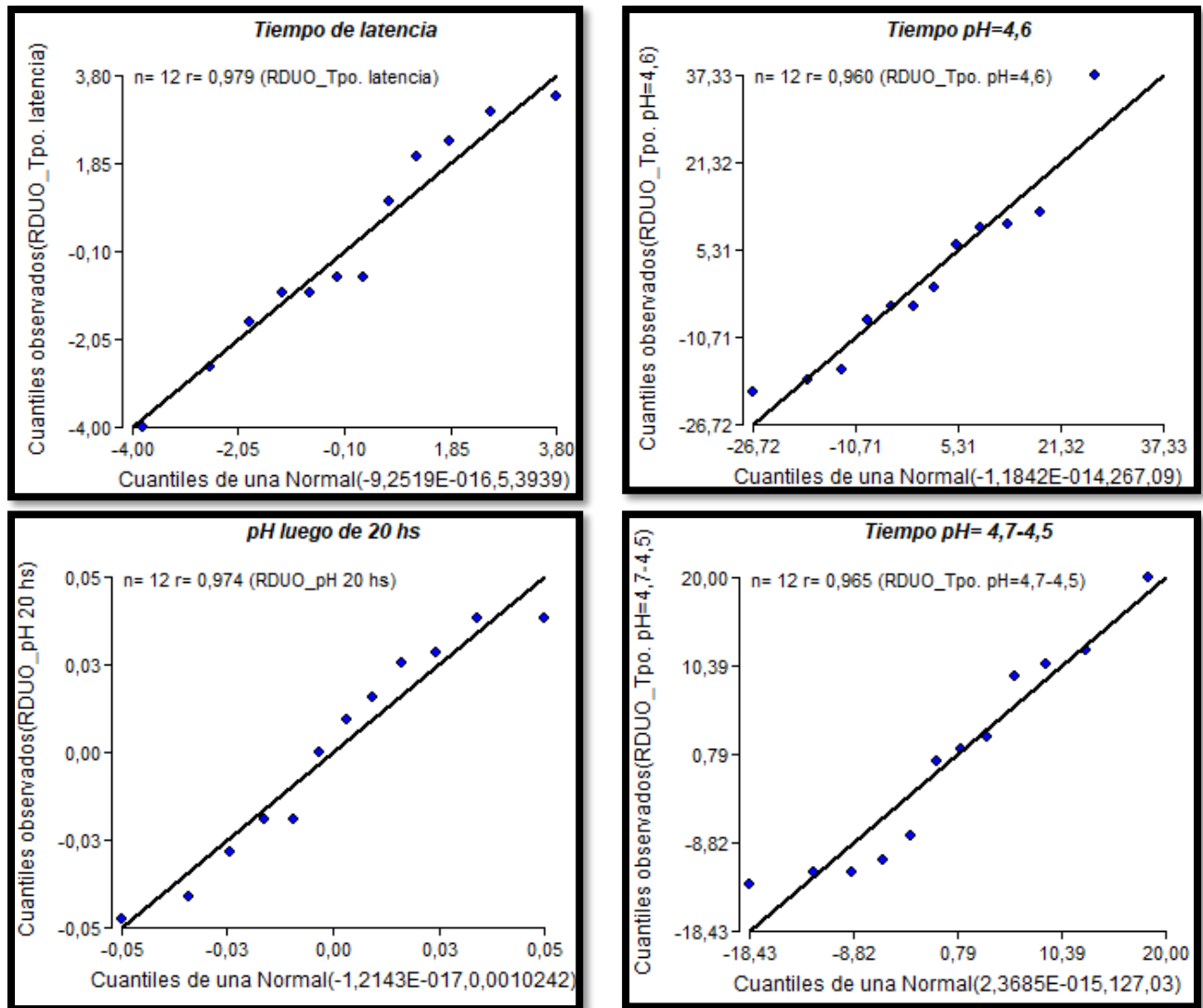


Figura 47. Gráficos *Q-Q Plot* correspondientes a los parámetros estudiados durante la etapa de acidificación (Feature Points).

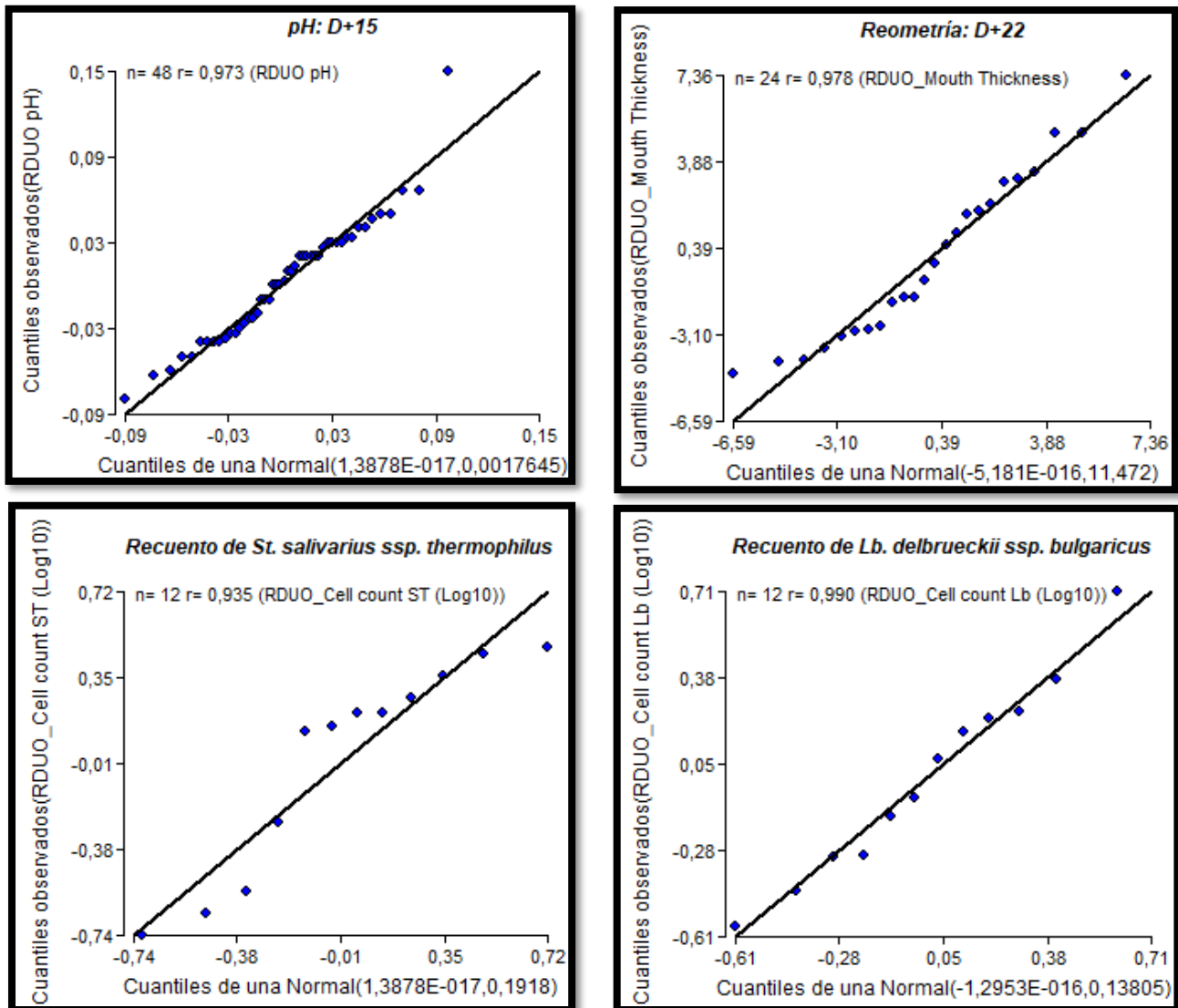


Figura 48. Gráficos *Q-Q Plot* correspondientes a los parámetros estudiados durante el seguimiento de la vida útil de los yogures.

En ambas figuras puede apreciarse que los datos se distribuyeron en la forma esperada alrededor de la recta (forma zig-zag), por lo que, a priori, los parámetros estudiados parecen ajustarse a una distribución normal.

Para confirmar lo anteriormente mencionado, se llevó a cabo el método analítico, que consiste en la realización de la prueba de Shapiro – Wilks, cuyos supuestos son:

H0: La variable tiene buen ajuste a la distribución normal.

H1: La variable no tiene buen ajuste a la distribución normal.

Para rechazar la hipótesis nula (H_0), el *p-value* obtenido debe ser menor al nivel de significación (0,05).

En la Tabla XVI se incluye lo brindado por el programa con respecto a esta prueba.

Tabla XVI: Resultados obtenidos al realizar la prueba de Shapiro-Wilks en cada parámetro estudiado.

Variable	n	D.E.	W*	p (Unilateral D)
RE pH	48	1,01	0,96	0,4112
RE Reometría	24	1,02	0,91	0,1228
RE Tpo. pH=4.6	12	1,04	0,92	0,4748
RE pH 20 hs	12	1,04	0,89	0,2038
RE Tpo. pH=4,7-4,5	12	1,04	0,88	0,1777
RE Tpo. latencia	12	1,04	0,92	0,4824
RE Recuento <i>St.</i>	12	1,04	0,83	0,0275
RE Recuento <i>Lb.</i>	12	1,04	0,96	0,8827

* W: Estadístico de la prueba Shapiro – Wilks modificado.

Se generó un *p-value* para cada variable por separado, por lo que se debió concluir de manera individual. En todas las variables se observó que el *p-value* fue mayor al nivel de significación, por lo que se aceptó H_0 , exceptuando el recuento de *St. thermophilus*. Por lo tanto, se concluyó que existen evidencias a favor de que el pH, la reometría, las variables del feature point y el recuento de *Lb. delbrueckii* tienen buen ajuste a la distribución normal.

7.1.1.2. Homocedasticidad

Para poder determinar el cumplimiento del próximo supuesto, la homocedasticidad, se procedió a corroborar la misma. Para ello, primero se generó un gráfico de dispersión considerando los residuos y predichos de las variables respuesta (pH, reometría, feature point y recuento de ambas cepas).

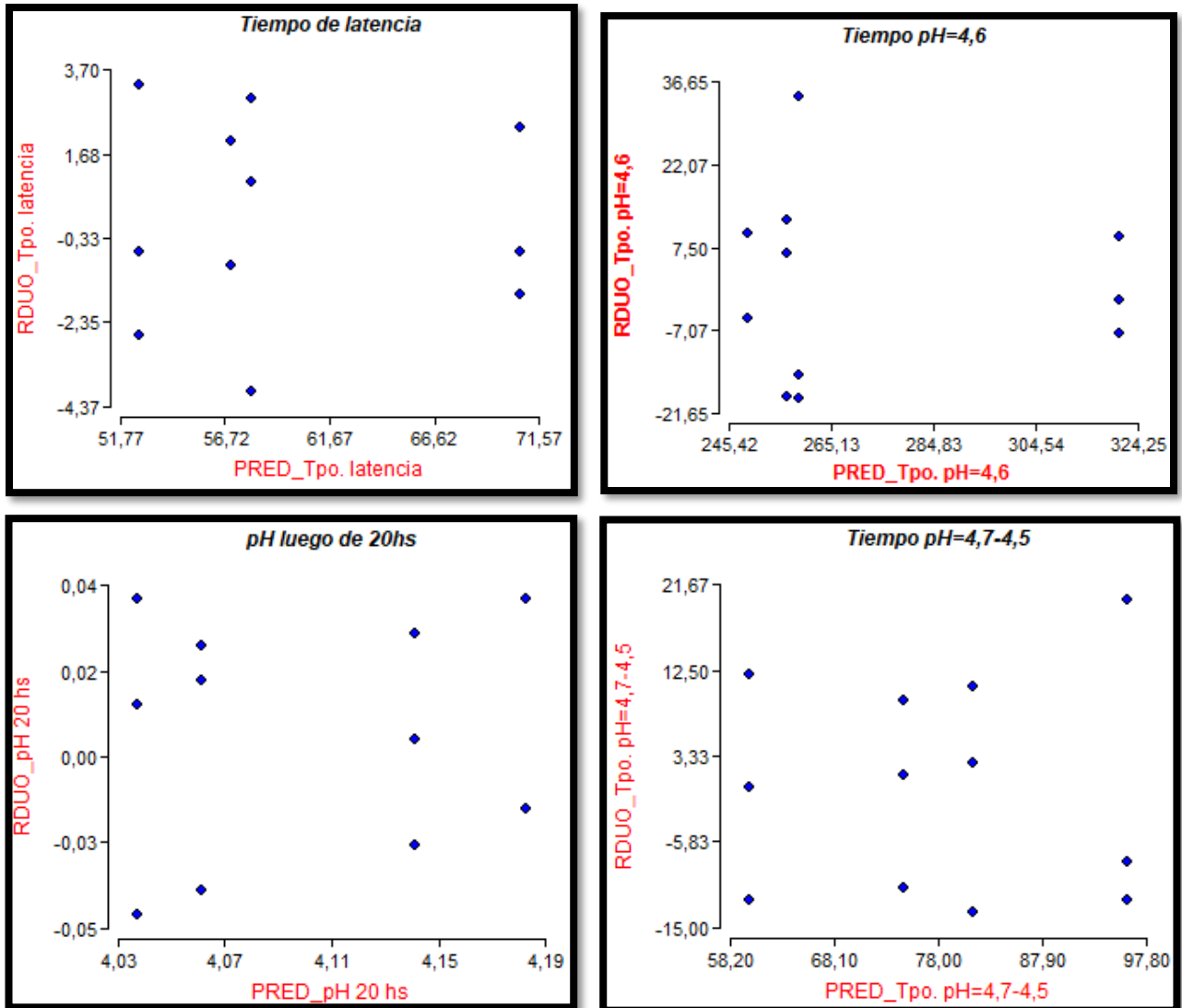


Figura 49. Diagrama de dispersión de los residuos de las variables correspondientes a la cinética de acidificación, en función de sus predichos.

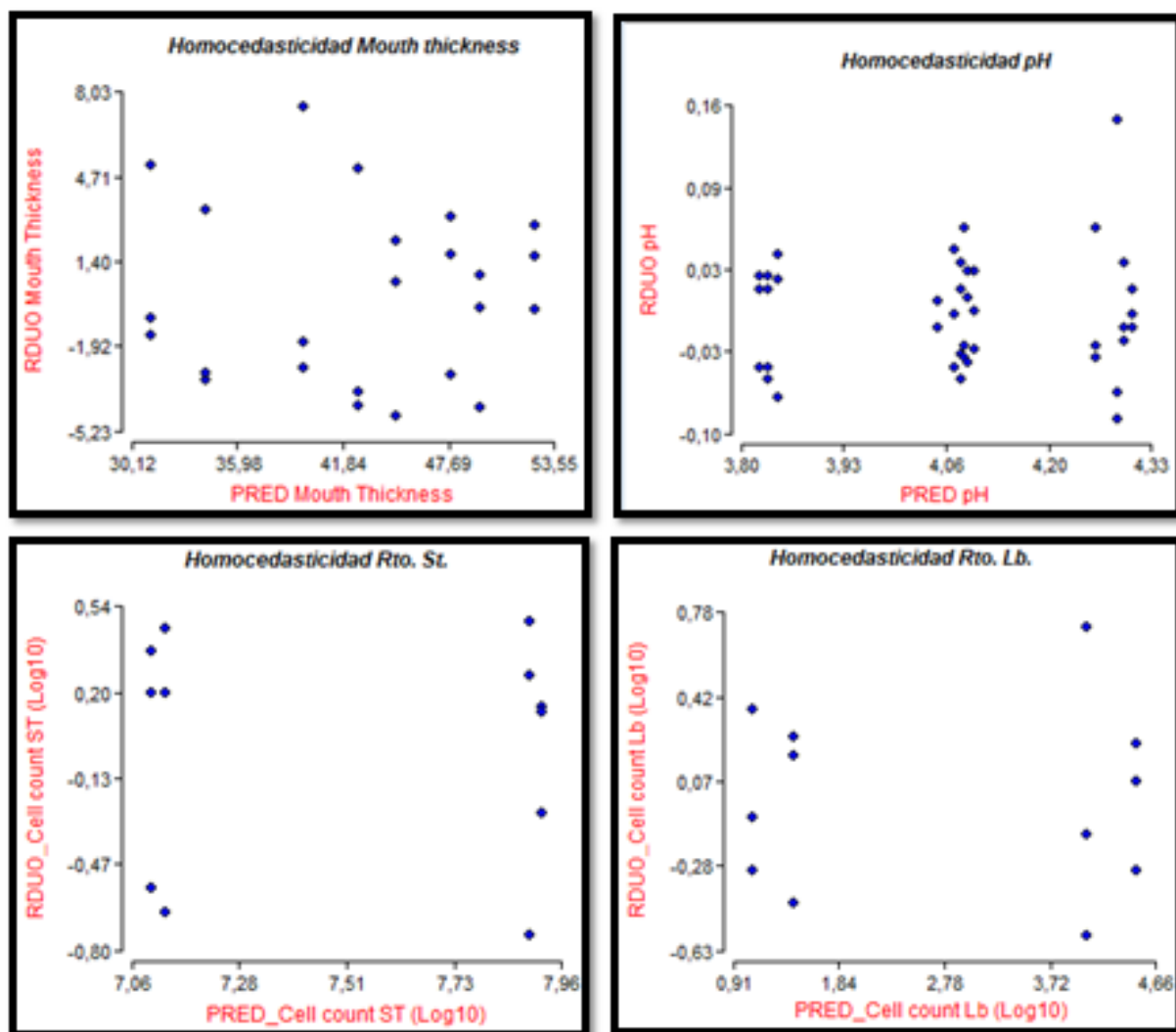


Figura 50. Diagrama de dispersión de los residuos de las variables estudiadas durante el seguimiento de la vida útil del yogur, en función de sus predichos.

Se contempla la existencia o no de homocedasticidad mediante la distribución de los datos. Para cumplirse dicha característica, los puntos deben ubicarse de manera uniforme y por igual en todos los casos.

Se puede observar en ambas figuras que existe una variación constante de los residuos de las variables en estudio, lo que indicaría presencia de homocedasticidad.

Para confirmar el cumplimiento de dicho supuesto, se prosiguió a realizar la prueba de Levene.

Las hipótesis para esta prueba son:

H0: Todas las varianzas de cada variable no difieren.

$$\sigma^2_1 = \sigma^2_2 = \sigma^2_3 = \sigma^2$$

H1: Alguna de las varianzas sí difiere.

Alguna $\sigma^2_i \neq \sigma^2$

La condición de rechazo de H₀ es que el *p-value* obtenido sea menor al nivel de significación estipulado ($\alpha < 0,05$). Para esta prueba, se emplearon los residuos absolutos de la variable respuesta. Estos resultados pueden ser visualizados en la Tabla XVII.

Tabla XVII: Resultados obtenidos a partir de la prueba de Levene.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS pH	48	0,13	0,05	82,45

F.V.	SC	gl	CM	F	<i>p-valor</i>
Modelo	0,01	4	1,30E-03	1,61	0,1886
Temp. almacenamiento	1,10E-03	1	1,10E-03	1,36	0,2501
Cultivo	4,00E-03	3	1,30E-03	1,7	0,1821
Error	0,03	43	7,80E-04		
Total	0,04	47			

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS Reometría	24	0.25	0,14	57,4

F.V.	SC	gl	CM	F	<i>p-valor</i>
Modelo	17,9	3	5,97	2,28	0,1105
Cultivo	17,9	3	5,97	2,28	0,1105
Error	52,36	20	2,62		
Total	70,26	23			

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS Recuento <i>St. thermophilus</i>	12	0,37	0,13	51,71

F.V.	SC	gl	CM	F	<i>p-valor</i>
Modelo	0,17	3	0,06	1,55	0,2749
Cultivo	0,17	3	0,06	1,55	0,2749
Error	0,29	8	0,04		
Total	0,46	11			

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS Recuento <i>Lb. delbrueckii</i>	12	0,32	0,06	62,01

F.V.	SC	gl	CM	F	<i>p-valor</i>
Modelo	0,13	3	0,04	1,23	0,3613
Cultivo	0,13	3	0,04	1,23	0,3613
Error	0,28	8	0,04		
Total	0,41	11			

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS Tpo latencia	12	0,24	0	59,18

F.V.	SC	gl	CM	F	<i>p-valor</i>
Modelo	3,37	3	1,12	0,85	0,5052
Cultivo	3,37	3	1,12	0,85	0,5052
Error	10,59	8	1,32		
Total	13,96	11			

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS Tpo. pH=4,6	12	0,59	0,44	52,83

F.V.	SC	gl	CM	F	<i>p-valor</i>
Modelo	446,07	3	148,69	3,91	0,0545
Cultivo	446,07	3	148,69	3,91	0,0545
Error	303,93	8	37,99		
Total	750	11			

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS pH 20hs	12	0,12	0	59,46

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2,8E-04	3	9,3E-05	0,35	0,7882
Cultivo	2,8E-04	3	9,3E-05	0,35	0,7882
Error	2,1E-03	8	2,6E-04		
Total	2,4E-03	11			

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS Tpo. pH=4,7-4,5	12	0,20	0	63,75

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	68,74	3	22,91	0,65	0,6064
Cultivo	68,74	3	22,91	0,65	0,6064
Error	283,26	8	35,41		
Total	352,00	11			

Como el *p-value* obtenido en los parámetros de estudio fue mayor que el nivel de significación, se aceptó H_0 y, por ende, se concluyó que existen evidencias a favor de que las varianzas de las variables en estudio no difieren. De esta manera, se evidenció que se cumple el supuesto de homocedasticidad.

7.1.1.3. Muestras aleatorias y observaciones independientes

Como se aclaró anteriormente, tanto el proceso productivo como el seguimiento se realizó por triplicado, siendo estas tres elaboraciones independientes entre sí. Además, las muestras tomadas a la hora de realizar el seguimiento, fueron seleccionadas de forma aleatoria.

El cumplimiento de ambos supuestos estudiados (normalidad y homocedasticidad), sumado al de las observaciones independientes, permite aplicar ANOVA en todas las variables dependientes estudiadas.

La excepción al cumplimiento de los tres parámetros es el recuento de *St. thermophilus* el cual no cumple con la normalidad (sí con los otros dos supuestos). Si

bien este parámetro no tiene buen ajuste a la distribución normal, al cumplir con el principio de homocedasticidad, es suficiente para poder aplicar ANOVA.

7.1.2. Resto del total de datos aportados por el programa al aplicar ANOVA de una vía en los Feature Points

- Tiempo transcurrido entre pH=4,7-4,5

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Tpo. pH= 4,7-4,5	12	0,59	0,44	16,94

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2010,67	3	670,22	3,84	0,0498
Cultivo	2010,67	3	670,22	3,84	0,0498
Error	1397,33	8	174,67		
Total	3408,00	11			

- Tiempo hasta alcanzar pH=4,6

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Tpo. pH= 4,6	12	0,77	0,68	7,05

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	9782,25	3	3260,75	8,88	0,0063
Cultivo	9782,25	3	3260,75	8,88	0,0063
Error	2938,00	8	367,25		
Total	12720,25	11			

- Tiempo de latencia

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Tpo. latencia	12	0,90	0,86	4,57

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	539,58	3	179,86	24,25	0,0002
Cultivo	539,58	3	179,86	24,25	0,0002
Error	59,33	8	7,42		
Total	598,92	11			

- pH transcurridas las 20 hs desde el comienzo de fermentación

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
pH 20hs	12	0,77	0,69	0,91

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,04	3	0,01	9,09	0,0059
Cultivo	0,04	3	0,01	9,09	0,0059
Error	0,01	8	1,4E-03		
Total	0,05	11			

7.2. Anexo B: Cronograma de las tres elaboraciones y sus respectivos seguimientos

Yogur Bebible	07/09/16	08/09/16	15/09/16	16/09/16	23/09/16	28/09/16	29/09/16	30/09/16	07/10/16	13/10/16	14/10/16	21/10/16	25/10/16	26/10/16	28/10/16	03/11/16	04/11/16	11/11/16	18/11/16	25/11/16	09/12/16	23/12/16	30/12/16	
Preparación de la Base	A1					A2							A3											
Fermentación 5 Litros		A1					A2							A3										
Shear stress			A1					A1	A2			A2				A3	A1		A3	A2		A3	A3	
pH 10°C			A1		A1			A1	A1,A2		A2	A1,A2			A2	A3	A1	A2,A3	A3	A2, A3	A3	A3	A3	
pH 25°C			A1		A1				A1,A2		A2					A3		A3						
Cell counts				A1				A1	A2			A2				A3	A1		A3	A2		A3	A3	
Seguimiento																								
D+8				A1					A2							A3								
D+15					A1					A2								A3						
D+22								A1				A2							A3					
D+29									A1						A2					A3				
D+43												A1						A2			A3			
D+57																	A1			A2		A3	A3	

Este trabajo de investigación fue presentado en el XVI congreso CYTAL-Mar del Plata del 18-20 de septiembre del 2017 dentro de la categoría póster.