

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctor en
Ciencias Biológicas

**PRODUCCIÓN Y EVALUACIÓN DE
LECHES FERMENTADAS PROBIÓTICAS
CON COLESTEROL REDUCIDO**

**Presentada por
Lic. Yanina Lorena Pavón**

**DIRECTOR: Dr. Sergio Darío Rozycki
CO-DIRECTORA: Dra. Pilar Buera**

Lugar de realización: Área Lácteos – Instituto de Tecnología de
Alimentos – Facultad de Ingeniería Química – Universidad Nacional del
Litoral

- 2014 -

Si lo puedes soñar, lo puedes lograr....
Walt Disney

Agradecimientos

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento:

Al Dr. Sergio Rozyccki, mi director, por haberme recibido como parte del grupo de investigación en el Área Lácteos del ITA, y que durante estos cinco años me ha enseñado, motivado y apoyado en todo momento para crecer no sólo profesionalmente sino también personalmente. Gracias, además, por incluirme siempre dentro de sus proyectos y darme la posibilidad de formar otros recursos humanos, como él lo ha hecho conmigo.

A la Dra. Pilar Buera, mi co-directora, y su grupo de trabajo del Departamento de Industrias de la UBA. Gracias a todos por haber compartido sus conocimientos y ayudarme con temas relacionados a la tesis.

A los miembros del jurado, por el interés y tiempo dedicados a la evaluación de la presente tesis.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por el otorgamiento de la Beca Doctoral y Post-doctoral.

A la Universidad Nacional del Litoral, que me ha formado desde mi carrera de grado y me ha dado el lugar para crecer profesionalmente, además de aportar los recursos necesarios para llevar a cabo esta investigación.

A Sandra, mi compañera incansable de trabajo, con la que hemos transitado todo este período juntas y hemos compartido experiencias únicas que nunca vamos a olvidar.

A todos los compañeros que han formado parte de los grupos de leche fermentada y queso untable (Carolina, Lucía, Eliana, Julio, Ariel, Santiago, Emilia, Gimena, Marcelo, Romina, Ignacio, Florencia, Natalia y Alejandra). Gracias por todos los momentos compartidos y por la colaboración de trabajo realizada. Gratos y hermosos recuerdos de cada uno de ellos.

Al Área de Evaluación Sensorial y al grupo de panelistas entrenados que ayudaron enormemente a enriquecer este trabajo. En especial, Nora, Silvia y Soledad, gracias por recibirme siempre para aclarar mis dudas, compartir buenas charlas y mates.

Al resto de las Áreas del Instituto de Tecnología de Alimentos que me han permitido utilizar equipos y han compartido sus conocimientos para ayudar en la realización de la presente tesis.

A Víctor Rozyccki, por su predisposición para enseñarme técnicas y manejo de software, además de ser una gran persona que siempre está dispuesta a ayudar.

A la Unión Europea, que a través del Programa de Becas Erasmus Mundus me ha brindado la posibilidad de realizar una estadía en el exterior para completar mi trabajo de tesis.

Al grupo del Departamento de Ciencia y Tecnología Agroambiental dirigido por el Prof. Bruno Biavati de la Universidad de Bologna. Gracias a todos por recibirme tan cordialmente, por compartir sus conocimientos. Ha sido una de las mejores experiencias que he vivido hasta el momento. Gracias especialmente, a Paola y Diana por ser excelentes personas y directoras.

A los grupos de INLAIN dirigidos por el Dr. Jorge Reinheimer y el grupo de la Dra. Patricia Rizzo de UNR con los cuales hemos participado conjuntamente en Congresos y Proyectos que han permitido plasmar varios de los tópicos aquí expuestos. Particularmente, al Dr. Gabriel Vinderola, por aportar sus conocimientos en el área de microbiología.

De forma especial, quiero agradecer a mi familia que me ha permitido estudiar lo que siempre me gustó y ha colaborado en la realización de mis sueños. Gracias por inculcarme el esfuerzo y dedicación con la que mis padres y hermana trabajan y que me posibilitaron poder llegar hasta acá. Agradezco su apoyo constante y motivación. Los amo con toda mi alma.

A mis amigos incondicionales: Romi, Berni, Chana, Dani y Maru, por la hermosa amistad que hemos forjado a lo largo de todos estos años. Porque siempre tengamos una anécdota linda y graciosa para contar y porque sigan siendo ese pilar fundamental en mi vida.

Al grupo de amigas de las peñas de los miércoles, gracias por haber sido un apoyo enorme en esta última etapa. He conocido a personas maravillosas que no solamente me han dado su amistad sino que también me han dado la posibilidad de mostrar otro lado de mi persona. Pauli, Gime, Nati, Elo, Sole, Romi, Luci, Ceci, Sole, Sandra, realmente son mi cable a tierra!

Al grupo de argentinos que he conocido durante mi estadía en Italia con los que he compartido agradables momentos, en especial a Laura, en quién encontré una amiga y excelente persona.

A todas las empresas que han brindado materias primas y equipos para que puedan llevarse a cabo los objetivos propuestos.

A los que ya no están, pero pasaron por mi vida, me apoyaron y ayudaron...

GRACIAS A TODOS!

La presente tesis dio lugar a las siguientes publicaciones y presentaciones a reuniones científicas:

Publicaciones:

- **Pavón, Y.;** Lazzaroni, S.; Rozycki, S. (2013). *Influencia de hidrocoloides nacionales sobre propiedades reológicas, físicas y sensoriales de leches fermentadas probióticas con colesterol reducido*. Alim. Latin. 305: 44-53. Editorial Publitec S.A. ISSN (versión impresa): 0325-3384.
- Lazzaroni, S.; **Pavón, Y.;** Rozycki, S. (2013). *Influencia del agregado de calcio y proteínas lácteas sobre las características reológicas y texturales de un queso untable probiótico con colesterol reducido*. Tecnol. Láctea Latin. 76: 40-48. Editorial Publitec S.A. ISSN (versión impresa): 0328-4158.
- Freire Costa, F.; Rozycki, S.; Colombatti, F.; Spotti, J.; Lazzaroni, S.; **Pavón, Y.** (2013). *Obtención de leche entera sin colesterol mediante el uso de β -ciclodextrina*. Rev. Inst. Lat. Candido Tostes. ISSN (versión on-line): 0100-3674.
- **Pavón, Y.;** Lazzaroni, S.; Sabbag, N.; Rozycki, S. (2014). *Simultaneous effects of gelatin and espina corona gum on rheological, physical and sensory properties of cholesterol-reduced probiotic yoghurts*. Int. J. Food Sci. Tech. (en prensa).

Presentaciones a reuniones científicas:

- Rozycki, S.; **Pavón, Y.;** López, M. C.; Torregiani, L.; Maidana, M.; Sabbag N.; Caballero, S. *Desarrollo de leche fermentada probiótica, sin colesterol. Estudio reológico y de vida útil*. V Congreso Latinoamericano de Profesionales y Estudiantes de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, CLECTA 5. Cuba, 2010.
- Rozycki, S.; **Pavón, Y.;** López, M. C.; Torregiani, L.; Maidana, M.; Sabbag, N.; Caballero, S. *Modelización del comportamiento reológico de leche entera fermentada probiótica, sin colesterol*. Congreso Mundial y Exposición Ingeniería 2010-Argentina. Buenos Aires, 2010.
- **Pavón, Yanina;** Rozycki, Sergio; Torregiani, Lucía; López, María Carolina. *Estudio de la influencia de hidrocoloides sobre la cinética de acidificación y parámetros fisicoquímicos, de leches fermentadas probióticas sin colesterol*. XIII Congreso Ciencia y Tecnología de los Alimentos CYTAL – AATA. Buenos Aires, octubre 2011.
- **Pavón, Yanina;** Lazzaroni, Sandra; Rozycki, Sergio; Costa, Silvia. *Efecto de espina corona y almidón modificado sobre las características reológicas y texturales de leches fermentadas probióticas sin colesterol*. XIII Congreso Ciencia y Tecnología de los Alimentos CYTAL – AATA. Buenos Aires, octubre 2011.
- Lazzaroni, Sandra; **Pavón, Yanina;** Sabbag, Nora; Caballero, María. *Evaluación de la influencia de hidrocoloides sobre las características reológicas y sensoriales de queso untable probiótico sin colesterol*. Congreso Ciencia y Tecnología de los Alimentos CYTAL – AATA. Buenos Aires, octubre 2011.
- Peggy Ponce-Cevallos, Florencia Mazzobre, Cristina dos Santos, Beatriz Elizalde, Sandra Lazzaroni, **Yanina Pavón,** Sergio Rozycki and Pilar Buera. *“Research on encapsulation systems for the industrial development of functional food products”*. 2nd ISEKI Food 2011 Conference. Milan, Italia. 2011.
- Rozycki, Sergio; **Pavón, Yanina;** Lazzaroni, Sandra; Rozycki, Víctor. *Optimización de características reológicas de leches fermentadas probióticas con*

colesterol reducido. Congreso Argentino de Biorreología, CAB. Rosario, marzo 2012.

- Rozycki, Sergio; Lazzaroni, Sandra; Manattini, Marcelo; Comeron, Romina; Salvo, Ignacio; **Pavón, Yanina**. *"Influencia de la concentración de calcio y de caseína sobre las características reológicas de queso untable probiótico con colesterol reducido"*. I Congreso Argentino de Biorreología, CAB 2012. Rosario, marzo 2012.
- **Yanina Pavón**, Sandra Lazzaroni, Sergio Rozycki, Irene Aloisio, Bruno Biavati, Paola Mattarelli, Diana Di Gioia. *"Prebiotic potential of old and new thickening agents for milk fermented products"*. 23rd International ICFMH Symposium, FoodMicro 2012. Estambul, Turquía. 2012.
- Sandra Lazzaroni, **Yanina Pavón**, Sergio Rozycki, Monica Modesto, Bruno Biavati, Diana Di Gioia, Paola Mattarelli. *"Selective media and identification for probiotics in commercial dairy products"*. 23rd International ICFMH Symposium, FoodMicro 2012. Estambul, Turquía. 2012.
- **Pavón, Yanina**; Rozycki, Sergio; Lazzaroni, Sandra; Alberto, Santiago; Regue, María; Barcarolo, Gimena. *"Efecto de la adición de calcio y caseínas sobre las propiedades físicas, sensoriales y reológicas de leches fermentadas con colesterol reducido"*. II Simposio Argentino de Lactología. Santa Fe, agosto 2012.
- **Pavón, Yanina**; Rozycki, Sergio; Lazzaroni, Sandra; Sabbag, Nora; Costa, Silvia; Caballero, Soledad. *"Características reológicas de leches fermentadas probióticas con colesterol reducido. Uso de espina corona como espesante no convencional"*. II Simposio Argentino de Lactología. Santa Fe, agosto 2012.
- **Pavón, Yanina**, Lazzaroni, Sandra, Rozycki, Sergio, Aloisio, Irene, Biavati, Bruno, Mattarelli, Paola, Di Gioia, Diana. *"Identificación de especies de bifidobacterias y lactobacilos, aisladas de productos lácteos presentes en el mercado europeo. Uso de espina corona como potencial compuesto prebiótico"*. II Simposio Argentino de Lactología. Santa Fe, agosto 2012.
- Lazzaroni, Sandra; **Pavón, Yanina**; Rozycki, Sergio; Modesto, Mónica; Biavati, Bruno; Di Gioia, Diana; Mattarelli, Paola. *"Supervivencia de bifidobacterias y lactobacilos en condiciones gastrointestinales simuladas, resistencia a antibióticos y comportamiento en matrices lácteas fermentadas"*. II Simposio Argentino de Lactología. Santa Fe, agosto 2012.
- Lazzaroni, Sandra, Rozycki, Sergio, **Pavón, Yanina**, Sabbag, Nora, Comerón, Romina, Manattini, Marcelo. *"Influencia de calcio y caseína sobre la textura de queso untable probiótico con colesterol reducido"*. II Simposio Argentino de Lactología. Santa Fe, agosto 2012.
- Lazzaroni, Sandra; Rozycki, Sergio; **Pavón, Yanina**; Costa, S.; Caballero, María S.; Freyre, Marcelino. *"Modelización del comportamiento reológico y sensorial de queso untable probiótico con colesterol reducido. Influencia de gelatina y goma espina corona"*. II Simposio Argentino de Lactología. Santa Fe, agosto 2012.

ÍNDICE

ÍNDICE	I
ÍNDICE DE TABLAS	X
ÍNDICE DE FIGURAS	XV
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	XXI
RESUMEN	XXIII
ABSTRACT	XXVI
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. ALIMENTOS FUNCIONALES.....	2
I.1.1. Dieta y salud, ¿por qué y cómo surgen los alimentos funcionales?.....	2
I.1.2. Concepto de alimento funcional	3
I.1.3. Tipos de alimentos funcionales.....	4
I.1.3.1. Alimentos funcionales adicionados con calcio.....	4
I.1.3.1.1. Osteoporosis y calcio.....	4
I.1.3.2. Alimentos funcionales para promover la salud cardiovascular	5
I.1.3.2.1. Enfermedades cardiovasculares	5
I.1.3.3. Alimentos funcionales para promover la salud gastrointestinal	6
I.1.3.3.1. Probióticos, prebióticos y simbióticos.....	6
I.1.3.4. Alimentos adicionados de aminoácidos esenciales	7
I.1.3.4.1. Proteínas del suero lácteo.....	7
I.1.4. Regulación de alimentos funcionales	8
I.1.5. Tendencias en el mercado lácteo	10
I.2. LECHES FERMENTADAS	10
I.2.1. Definición	11
I.2.2. Clasificación	11
I.2.3. Valor nutricional	12
I.2.4. Consumo de leches fermentadas en el mercado argentino.....	13
I.3. LECHES FERMENTADAS PROBIÓTICAS CON COLESTEROL REDUCIDO	14
I.3.1. Constituyentes	14
I.3.1.1. Leche.....	14
I.3.1.1.1. Principales componentes de la leche	14
I.3.1.1.1.1. Agua.....	16

I.3.1.1.1.2. Sustancias nitrogenadas	16
I.3.1.1.1.2.1. Caseínas.....	17
I.3.1.1.1.2.2. Proteínas del suero.....	19
I.3.1.1.1.3. Hidratos de carbono	20
I.3.1.1.1.4. Lípidos.....	20
I.3.1.1.1.4.1. Composición.....	20
I.3.1.1.1.4.2. Estructura del glóbulo graso	22
I.3.1.1.1.4.3. Lípidos y su asociación con enfermedades cardiovasculares.....	23
I.3.1.1.1.4.4. Revalorización de la grasa láctea.....	25
I.3.1.1.1.5. Sales.....	26
I.3.1.1.2. Leche en polvo entera.....	26
I.3.1.1.3. Leche en polvo descremada	27
I.3.1.2. Cultivo iniciador-acidificante	27
I.3.1.2.1. Bacterias acidolácticas	27
I.3.1.2.1.1. Principales grupos.....	28
I.3.1.2.2. Rol de las bacterias acidolácticas en la elaboración de leches fermentadas.....	28
I.3.1.3. Microorganismo probiótico	29
I.3.1.3.1. Consideraciones para la utilización de probióticos en productos lácteos	29
I.3.1.3.2. <i>Lactobacillus rhamnosus</i> como probiótico	30
I.3.1.4. Concentrado de proteínas del suero	31
I.3.1.5. Endulzantes	32
I.3.1.5.1. Sacarosa.....	32
I.3.1.6. Aditivos.....	32
I.3.1.6.1. Definición.....	32
I.3.1.6.2. Hidrocoloides	33
I.3.1.6.2.1. Generalidades.....	33
I.3.1.6.2.2. Clasificación	34
I.3.1.6.2.3. Galactomananos	34
I.3.1.6.2.3.1. Goma espina corona.....	35
I.3.1.6.2.4. Almidones	37
I.3.1.6.2.4.1. Almidones nativos y modificados.....	37
I.3.1.6.2.4.2. Almidón modificado de mandioca.....	38
I.3.1.6.2.5. Gelatina	38
I.3.1.6.3. Citrato de calcio.....	39
I.3.1.6.4. Conservantes	39
I.3.1.6.5. Aromatizantes.....	40

I.3.1.6.6. Betaciclodextrina.....	40
I.3.2. Tecnología para la producción	41
I.3.2.1. Preparación de la “mezcla base”	41
I.3.2.2. Tratamiento térmico.....	41
I.3.2.3. Homogeneización.....	42
I.3.2.4. Extracción de colesterol con betaciclodextrina	44
I.3.2.5. Fermentación.....	45
I.3.2.6. Enfriamiento y conservación.....	46
I.4. ESTUDIOS DE CALIDAD, ESTABILIDAD Y VIDA ÚTIL EN LECHE FERMENTADAS	46
I.4.1. Reología	47
I.4.1.1. Conceptos generales	47
I.4.1.1.1. Reología y comportamiento de los materiales	47
I.4.1.1.2. Parámetros reológicos: esfuerzo de corte (τ), gradiente de deformación ($\dot{\gamma}$) y viscosidad (μ)	48
I.4.1.1.3. Clasificación de fluidos	49
I.4.1.1.3.1. Fluidos newtonianos	49
I.4.1.1.3.2. Fluidos no newtonianos.....	50
I.4.1.1.3.2.1. Fluidos independientes del tiempo	50
I.4.1.1.3.2.2. Fluidos dependientes del tiempo	51
I.4.1.1.4. Reometría	53
I.4.1.1.4.1. Viscosímetro de cilindros concéntricos.....	54
I.4.1.1.5. Modelos de ajuste para fluidos no newtonianos	55
I.4.1.1.6. Importancia de las determinaciones reométricas	57
I.4.2. Análisis sensorial	57
I.4.2.1. Tipos de pruebas sensoriales.....	58
I.4.2.2. Análisis descriptivo cuantitativo (QDA)	59
I.4.2.3. Escalas sensoriales	60
I.4.3. Análisis de perfil de textura instrumental.....	60
I.4.4. Sinéresis.....	63
I.4.5. Composición química	63
I.4.6. Actividad de agua.....	63
I.4.7. pH y acidez.....	64
I.4.8. Recuento del microorganismo probiótico.....	65

I.5. DISEÑOS EXPERIMENTALES Y TRATAMIENTO ESTADÍSTICO	65
I.5.1. Conceptos y definiciones	66
I.5.1.1. Experimento.....	66
I.5.1.2. Unidad experimental	66
I.5.1.3. Variables, factores y niveles.....	66
I.5.2. Etapas en el diseño de experimentos	67
I.5.3. Diseños factoriales	68
I.5.3.1. Tipos de diseños factoriales.....	68
I.5.4. Diseño de Box-Behnken	69
I.5.5. Análisis de varianza y modelos de regresión lineal múltiple	69
I.5.6. Metodología de superficie de respuesta.....	71
I.6. RELEVANCIA DEL PRODUCTO OBTENIDO Y ESTUDIO REALIZADO	72
CAPÍTULO II. OBJETIVOS.....	73
II.1. OBJETIVO GENERAL.....	74
II.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	74
CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS	75
III.1. SECCIÓN I.....	76
III.1.1. Insumos	76
III.1.1.1. Materias primas y aditivos.....	76
III.1.1.2. Reactivos químicos.....	76
III.1.1.3. Insumos microbiológicos.....	76
III.1.2. Métodos	77
III.1.2.1. Diseños experimentales	77
III.1.2.1.1. Caso de estudio 1: Efecto del contenido de hidrocoloides sobre las características fisicoquímicas, reológicas, texturales, microbiológicas y sensoriales de leches fermentadas probióticas con colesterol reducido.....	77
III.1.2.1.2. Caso de estudio 2: Efecto de las condiciones de coagulación sobre las características fisicoquímicas, reológicas, texturales, microbiológicas y sensoriales de leches fermentadas probióticas con colesterol reducido.....	78
III.1.2.2. Protocolo de elaboración de leches fermentadas probióticas con colesterol reducido.....	79
III.1.2.3. Determinación de la concentración de colesterol	82
III.1.2.3.1. Saponificación.....	82

III.1.2.3.2. Extracción de colesterol	82
III.1.2.3.3. Cuantificación del colesterol por el método enzimático-colorimétrico.....	82
III.1.2.3.4. Cálculo de la concentración de colesterol	82
III.1.2.4. Estudio de las propiedades fisicoquímicas, reológicas, sensoriales, microbiológicas y texturales de leches fermentadas probióticas.....	84
III.1.2.4.1. Estudio de la cinética de acidificación durante la fermentación	84
III.1.2.4.2. Determinación de pH y acidez titulable durante la vida útil	84
III.1.2.4.3. Determinación de la composición química.....	85
III.1.2.4.3.1. Contenido de grasa.....	85
III.1.2.4.3.2. Contenido de nitrógeno total y proteína total	86
III.1.2.4.3.3. Contenido de cenizas.....	87
III.1.2.4.3.4. Contenido de sólidos totales	87
III.1.2.4.3.5. Contenido de hidratos de carbono	88
III.1.2.4.3.6. Contenido de humedad	88
III.1.2.4.4. Determinación de la actividad acuosa	88
III.1.2.4.5. Determinación de la retención de agua.....	88
III.1.2.4.5.1. Índice de retención de agua en condiciones aceleradas (por centrifugación).....	88
III.1.2.4.5.2. Índice de retención de agua en condiciones estáticas (por acción de la gravedad).....	89
III.1.2.4.6. Determinación de parámetros reológicos por viscosimetría de cilindros concéntricos.....	89
III.1.2.4.6.1. Determinación del esfuerzo de corte (τ) en función del gradiente de deformación ($\dot{\gamma}$)	89
III.1.2.4.6.2. Determinación del esfuerzo de corte (τ) en función del tiempo de cizallamiento.....	90
III.1.2.4.7. Determinación del perfil de textura por penetrometría	90
III.1.2.4.8. Análisis sensorial.....	91
III.1.2.4.8.1. Descriptores de textura.....	91
III.1.2.4.8.2. Descriptores de <i>flavor</i>	91
III.1.2.4.8.3. Defectos	92
III.1.2.4.9. Análisis microbiológico.....	92
III.1.2.5. Análisis de resultados	93
 III.2. SECCIÓN II.....	 95
III.2.1. Aislamiento, identificación y caracterización de lactobacilos y bifidobacterias	95

III.2.1.1. Aislamiento de cepas probióticas a partir de productos lácteos comerciales	95
III.2.1.1.1. Medios y condiciones de cultivo selectivas	95
III.2.1.1.2. Toma de muestra, dilución e inoculación.....	96
III.2.1.2. Revitalización de cepas de colección	96
III.2.1.3. Identificación fenotípica.....	97
III.2.1.4. Obtención de cultivos puros concentrados	97
III.2.1.5. Identificación molecular o genotípica	97
III.2.1.5.1. Extracción de ADN	97
III.2.1.5.2. PCR especie-específica y electroforesis en geles de agarosa.....	99
III.2.1.5.3. ERIC-PCR y electroforesis en geles de agarosa	100
III.2.2. Evaluación del consumo de compuestos prebióticos y aditivos espesantes por parte de los microorganismos testeados	100
III.2.2.1. Obtención de los cultivos.....	101
III.2.2.2. Ensayo de fermentación.....	102
III.2.3. Ensayo de resistencia a condiciones gastrointestinales simuladas de los cultivos puros	102
III.2.3.1. Preparación de los cultivos.....	103
III.2.3.2. Resistencia al bajo pH (2,5) + pepsina	103
III.2.3.3. Resistencia a bilis (2%)	104
III.2.4. Ensayo de susceptibilidad a antibióticos	104
III.2.4.1. Preparación de los cultivos.....	105
III.2.4.2. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM).....	105
III.2.5. Elaboración de leches fermentadas con diferentes cepas testeadas.....	105
III.2.5.1. Preparación del cultivo de microorganismo para inocular	106
III.2.5.2. Ensayo de resistencia a condiciones gastrointestinales simuladas de las cepas contenidas en el producto.....	106
III.2.5.2.1. Resistencia a bajo pH (2,5) + pepsina	107
III.2.5.2.2. Resistencia a bilis (2%).....	107
III.2.6. Liofilización de cepas identificadas.....	107
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	108
IV.1. CUANTIFICACIÓN DE COLESTEROL.....	109
IV.2. CASO DE ESTUDIO 1: EFECTO DEL CONTENIDO DE HIDROCOLOIDES SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS, REOLÓGICAS, TEXTURALES Y SENSORIALES DE LECHES FERMENTADAS PROBIÓTICAS CON COLESTEROL REDUCIDO.....	110

IV.2.1. Análisis de la cinética de acidificación durante las fermentaciones	111
IV.2.2. Análisis de la variación de pH y acidez titulable durante la vida útil	117
IV.2.3. Análisis de la composición química.....	120
IV.2.4. Análisis de la actividad de agua	122
IV.2.5. Análisis de la retención de agua.....	122
IV.2.5.1. Determinación del índice de retención de agua por acción de la gravedad.....	122
IV.2.5.2. Determinación del índice de retención de agua por centrifugación	124
IV.2.5.3. Comparación de ambos métodos.....	125
IV.2.6. Recuento del microorganismo probiótico	126
IV.2.7. Análisis de la reometría destructiva con viscosímetro de cilindros concéntricos.....	128
IV.2.7.1. Reogramas de esfuerzo de corte (τ) en función del gradiente de deformación ($\dot{\gamma}$)	128
IV.2.7.1.1. Análisis de las curvas de flujo superiores (gradientes de deformación crecientes)	130
IV.2.7.1.2. Análisis de las curvas de flujo inferiores (gradientes de deformación decrecientes)	136
IV.2.7.1.3. Análisis de la viscosidad aparente (μ_{ap}) a gradiente de deformación 50 s^{-1}	139
IV.2.7.2. Análisis del índice de tixotropía.....	141
IV.2.7.3. Variación del esfuerzo de corte (τ) en función del tiempo de cizallamiento.....	144
IV.2.8. Análisis del perfil de textura por penetrometría	149
IV.2.8.1. Dureza.....	149
IV.2.8.2. Adhesividad	153
IV.2.8.3. Elasticidad	154
IV.2.8.4. Cohesividad.....	155
IV.2.8.5. Gomosidad y Masticabilidad.....	157
IV.2.9. Análisis sensorial	159
IV.2.9.1. Descriptores de textura	159
IV.2.9.2. Descriptores de <i>flavor</i>	169
IV.2.9.3. Defectos.....	176
IV.2.10. Optimización de múltiples respuestas	179
IV.2.11. Verificación de los modelos obtenidos con experiencias complementarias	183

IV.3. CASO DE ESTUDIO 2: EFECTO DE LAS CONDICIONES DE COAGULACIÓN SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS, REOLÓGICAS, TEXTURALES Y SENSORIALES DE LECHE FERMENTADAS PROBIÓTICAS CON COLESTEROL REDUCIDO.....	184
IV.3.1. Análisis de la cinética de acidificación durante las fermentaciones	185
IV.3.2. Análisis de la variación de pH y acidez titulable durante la vida útil.....	189
IV.3.3. Análisis de la composición química.....	192
IV.3.4. Análisis de la actividad acuosa	193
IV.3.5. Análisis de la retención de agua.....	194
IV.3.5.1. Determinación del índice de retención de agua por acción de la gravedad.....	194
IV.3.5.2. Determinación del índice de retención de agua por centrifugación	194
IV.3.6. Recuento del microorganismo probiótico.....	196
IV.3.7. Análisis de la reometría destructiva con viscosímetro de cilindros concéntricos.....	198
IV.3.7.1. Reogramas de esfuerzo de corte (τ) en función del gradiente de deformación ($\dot{\gamma}$)	198
IV.3.7.1.1. Análisis de las curvas de flujo superiores (gradientes de deformación crecientes)	198
IV.3.7.1.2. Análisis de las curvas de flujo inferiores (gradientes de deformación decrecientes)	203
IV.3.7.1.3. Análisis de la viscosidad aparente (μ_{ap}) a gradiente de deformación 50 s^{-1}	205
IV.3.7.2. Análisis del índice de tixotropía.....	207
IV.3.7.3. Variación del esfuerzo de corte (τ) en función del tiempo de cizallamiento.....	208
IV.3.8. Análisis del perfil de textura por penetrometría.....	214
IV.3.8.1. Dureza.....	215
IV.3.8.2. Adhesividad.....	219
IV.3.8.3. Elasticidad.....	220
IV.3.8.4. Cohesividad.....	221
IV.3.8.5. Gomosidad y Masticabilidad.....	222
IV.3.9. Análisis sensorial	223
IV.3.9.1. Descriptores de textura	223
IV.3.9.2. Descriptores de <i>flavor</i>	228
IV.3.9.3. Defectos.....	234

IV.4. UTILIZACIÓN DE COMPUESTOS PREBIÓTICOS COMERCIALES Y ADITIVOS ESPESANTES, SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS Y RESISTENCIA A CONDICIONES GASTROINTESTINALES SIMULADAS POR MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS. SUPERVIVENCIA EN LA MATRIZ DEL PRODUCTO	236
IV.4.1. Aislamiento, identificación y caracterización de las cepas probióticas utilizadas	236
IV.4.2. Fermentación de compuestos prebióticos y aditivos espesantes.....	239
IV.4.3. Estudio de supervivencia en condiciones gastrointestinales simuladas y susceptibilidad a antibióticos	245
IV.4.4. Viabilidad de cepas probióticas en leches fermentadas y resistencia en condiciones gastrointestinales simuladas luego de ser incorporadas a la matriz del producto.....	249
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES	253
CONSIDERACIONES FINALES – PERSPECTIVAS FUTURAS	259
CAPÍTULO VI. BIBLIOGRAFÍA	260
ANEXOS	279
ANEXO I.....	280
ANEXO II.....	284

Índice de tablas

Tabla I.1. Composición media en porcentaje (% m/m) de la leche entera de vaca.....	15
Tabla I.2. Concentración media de sustancias nitrogenadas (% nitrógeno total) de la leche de vaca.....	16
Tabla I.3. Diferencias más destacables entre caseínas y proteínas	17
Tabla I.4. Composición media porcentual (% m/m) de lípidos de la leche entera	21
Tabla I.5. Clasificación general básica de los fluidos no newtonianos	50
Tabla I.6. Definición de las propiedades mecánicas de textura	62
Tabla III.1. Dominio experimental del diseño de Box-Behnken utilizado para el caso de estudio 1.....	78
Tabla III.2. Dominio experimental del diseño factorial utilizado para el caso de estudio 2.....	79
Tabla III.3. Respuestas estudiadas para ambos casos de estudio y tiempo en el cual se efectuó el análisis.....	90
Tabla III.4. Composición medio MRS modificado	101
Tabla III.5. Composición medio TPY modificado	101
Tabla IV.1. Corridas experimentales del diseño de Box-Behnken para el estudio de hidrocoloides con los valores de las variables codificadas y sin codificar. (%G: % m/m Gelatina (X_1), %AMM: %m/m Almidón modificado de mandioca (X_2), %GEC: %m/m Goma espina corona (X_3))	110
Tabla IV.2. Valores de $V_{máx}$ (valor absoluto), $t_{V_{máx}}$, $pH_{V_{máx}}$ y t_f para las cinéticas de acidificación de las diferentes muestras del caso de estudio 1	113
Tabla IV.3. Coeficientes de regresión del modelo polinomial de segundo orden para las respuestas $V_{máx}$, $pH_{V_{máx}}$, $t_{V_{máx}}$ y t_f y estadísticos obtenidos a partir del análisis ANOVA de cada modelo para las leches fermentadas probióticas con colesterol reducido del caso de estudio 1	114
Tabla IV.4. Valores medios de pH y acidez (mol/L ácido láctico) y porcentaje de variación de los mismos (V%, expresados en valor absoluto) durante el almacenamiento de las diferentes experiencias de leches fermentadas probióticas con colesterol reducido, para el caso de estudio 1.....	118
Tabla IV.5. Composición química promedio (% m/m) para los diferentes muestras de leches fermentadas al día 17 de almacenamiento para el caso de estudio 1.....	120
Tabla IV.6. Actividad acuosa (a_w) promedio de todas las experiencias al día 15 de almacenamiento, correspondiente al caso de estudio 1.....	122
Tabla IV.7. IRA% promedio por acción de la gravedad y variación porcentual (V%) para las muestras durante el almacenamiento (3, 17 y 31 días) para el caso de estudio1	123

Tabla IV.8. IRA% promedio por centrifugación y variación porcentual (V%) de las muestras durante el almacenamiento (3,17 y 31 días) para el caso de estudio 1 124

Tabla IV.9. Recuento de *Lactobacillus rhamnosus* Sp1 (logUFC.g⁻¹) y variación porcentual (V%) durante el almacenamiento para las muestras de leches fermentadas probióticas con colesterol reducido, para el caso de estudio 1 127

Tabla IV.10. Valores promedios estimados de los parámetros reológicos: *K superior* (K_s), *K inferior* (K_i), *n superior* (n_s) y *n inferior* (n_i), viscosidad aparente (μ_{ap50} , medida a gradiente de deformación de 50 s⁻¹), índice de tixotropía (*IT*) y variación porcentual (V%) de cada uno, para los diferentes reogramas obtenidos a partir de las experiencias del caso de estudio 1 a los 3 y 31 días de almacenamiento. 129

Tabla IV.11. Coeficientes de regresión del modelo polinomial de segundo orden para K_s , n_s , K_i , n_i , μ_{ap50} e *IT* (utilizando las variables del diseño codificadas) y estadísticos obtenidos a partir del análisis ANOVA de cada modelo, para el día 3 y 31 de almacenamiento de las leches fermentadas probióticas con colesterol reducido obtenidas para el caso de estudio 1 131

Tabla IV.12. Valores promedios estimados de los parámetros reológicos: *resistencia máxima inicial* (*A*), *velocidad de ruptura estructural* (*B*) y variación porcentual (V%) de cada uno, para las experiencias del caso de estudio 1, a los 3 y 31 días de almacenamiento 144

Tabla IV.13. Coeficientes de regresión del modelo polinomial de segundo orden para *A*, *B*, (utilizando las variables del diseño codificadas) y estadísticos obtenidos a partir del análisis ANOVA de cada modelo, para el día 3 y 31 de almacenamiento de las leches fermentadas probióticas con colesterol reducido obtenidas para el caso de estudio 1 145

Tabla IV.14. Valores promedios estimados de los parámetros de perfil de textura por penetrometría: *Dureza* (*Du*), *Adhesividad* (*Ad*), *Elasticidad* (*El*), *Cohesividad* (*Coh*), *Gomosidad* (*Go*) y *Masticabilidad* (*Ma*) y variación porcentual (V%) de los mismos, estimados a partir de las curvas Fuerza vs. tiempo para las leches fermentadas probióticas con colesterol reducido del caso de estudio 1, a los 3 y 31 días de almacenamiento 150

Tabla IV.15. Coeficientes de regresión del modelo polinomial de segundo orden para *Dureza* (*Du*), *Adhesividad* (*Ad*), *Cohesividad* (*Coh*), *Gomosidad* (*Go*) y *Masticabilidad* (*Ma*) (utilizando las variables del diseño codificadas) y estadísticos obtenidos a partir del análisis ANOVA de cada modelo, para el día 3 y 31 de almacenamiento de las leches fermentadas probióticas con colesterol reducido obtenidas para el caso de estudio 1 151

Tabla IV.16. Puntajes promedios para los descriptores de textura: *Consistencia* (*Co*), *Creosidad* (*Cre*), *Aspereza* (*Asp*) y *Astringencia* (*Ast*) y variación porcentual (V%) de las muestras de leches fermentadas probióticas con colesterol reducido evaluadas sensorialmente a los 3 y 31 días de vida útil para el caso de estudio 1 161

Tabla IV.17. Coeficientes de regresión del modelo polinomial de segundo orden para los descriptores de textura: *Consistencia* (*Co*), *Creosidad* (*Cre*), *Aspereza* (*Asp*) y *Astringencia* (*Ast*) (utilizando las variables del diseño codificadas) y estadísticos obtenidos a partir del análisis ANOVA de cada modelo, para el día 3 y 31 de almacenamiento de las leches

fermentadas probióticas con colesterol reducido obtenidas para el caso de estudio 1	163
Tabla IV.18. Puntajes medios ponderados y porcentajes percibidos para los atributos de <i>flavor: "crema", "suero", "leche en polvo"</i> para las diferentes muestras ensayadas del diseño de Box-Behnken a los 3 y 31 días de almacenamiento, para el caso de estudio 1	170
Tabla IV.19. Puntajes medios ponderados y porcentajes percibidos para los atributos de <i>flavor: "cocido", "ácido", "dulce"</i> para las diferentes muestras ensayadas del diseño de Box-Behnken a los 3 y 31 días de almacenamiento, para el caso de estudio 1.....	174
Tabla IV.20. Puntaje promedio de los defectos hallados por los panelistas entrenados en función de las experiencias y el tiempo de almacenamiento, para el caso de estudio 1	176
Tabla IV.21. Criterio de optimización adoptado en los diferentes factores (G, AMM, GEC) y respuestas ($V_{máx}$, t_{fin} , $Ks_{día31}$, $A_{día31}$, $B_{día31}$, $Co_{día31}$, $Cre_{día31}$, $Asp_{día31}$, $Ast_{día31}$, $Du_{día31}$) y solución óptima para obtener leches fermentadas probióticas con colesterol reducido del tipo batido y tipo firme, para el caso de estudio 1	182
Tabla IV.22. Corridas experimentales del diseño factorial para el estudio de condiciones de coagulación con los valores de las variables codificadas y sin codificar. (%CAL: % m/m calcio (X_1), %CAS: %m/m Caseína (X_2)).....	184
Tabla IV.23. Valores de $V_{máx}$ (valor absoluto), $t_{V_{máx}}$, $pH_{V_{máx}}$ y t_f para las cinéticas de acidificación de las diferentes muestras del caso de estudio 2	186
Tabla IV.24. Coeficientes de regresión del modelo polinomial de segundo orden para $V_{máx}$ y estadísticos obtenidos a partir del análisis ANOVA del modelo para las leches fermentadas probióticas con colesterol reducido obtenidas para el caso de estudio 2	186
Tabla IV.25. Valores medios de pH y acidez (mol/L ácido láctico) y porcentaje de variación de los mismos (V%) durante el almacenamiento de las diferentes experiencias de leches fermentadas probióticas con colesterol reducido, para el caso de estudio 2	190
Tabla IV.26. Composición química promedio (% m/m) de las diferentes experiencias al día 17 de almacenamiento para el caso de estudio 2.....	192
Tabla IV.27. Actividad acuosa (a_w) promedio de todas las experiencias al día 17 de almacenamiento para todas las experiencias correspondientes al caso de estudio 2	193
Tabla IV.28. IRA% promedio por acción de la gravedad para las muestras durante el almacenamiento (3, 17 y 31 días) para el caso de estudio 2	194
Tabla IV.29. IRA% promedio por centrifugación para las muestras durante el almacenamiento (3,17 y 31 días) para el caso de estudio 2	195
Tabla IV.30. Recuento de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> Sp1 (log UFC.g ⁻¹) y variación porcentual (V%) durante el almacenamiento para las muestras de leches fermentadas probióticas con colesterol reducido, para el caso de estudio 2.....	196

Tabla IV.31. Valores promedios estimados de los parámetros reológicos: K superior (K_s), K inferior (K_i), n superior (n_s) y n inferior (n_i), viscosidad aparente a gradiente de deformación $50\ s^{-1}$ (μ_{ap50}) e índice de tixotropía (IT) y variación porcentual ($V\%$) de cada uno, para los diferentes reogramas obtenidos a partir de las experiencias del caso de estudio 2, a los 3 y 31 días de almacenamiento 199

Tabla IV.32. Coeficientes de regresión del modelo polinomial de segundo orden para K_s , n_s , K_i , n_i , μ_{ap50} e IT (utilizando las variables del diseño codificadas) y estadísticos obtenidos a partir del análisis ANOVA de cada modelo, para el día 3 y 31 de almacenamiento de las leches fermentadas probióticas con colesterol reducido obtenidas para el caso de estudio 2 200

Tabla IV.33. Valores promedios estimados de los parámetros reológicos: resistencia máxima inicial (A), velocidad de ruptura estructural (B) y variación porcentual ($V\%$) de cada uno, para las experiencias del caso de estudio 2, a los 3 y 31 días de almacenamiento 209

Tabla IV.34. Coeficientes de regresión del modelo polinomial de segundo orden para A , B , (utilizando las variables del diseño codificadas) y estadísticos obtenidos a partir del análisis ANOVA de cada modelo, para el día 3 y 31 de almacenamiento de las leches fermentadas probióticas sin colesterol obtenidas para el caso de estudio 2 210

Tabla IV.35. Valores promedios estimados de los parámetros de perfil de textura por penetrometría: Dureza (Du), Adhesividad (Ad), Elasticidad (El), Cohesividad (Coh), Gomosidad (Go) y Masticabilidad (Ma) y variación porcentual ($V\%$) de los mismos, estimados a partir de las curvas Fuerza vs. tiempo para las leches fermentadas probióticas con colesterol reducido del caso de estudio 2, a los 3 y 31 días de almacenamiento 216

Tabla IV.36. Coeficientes de regresión del modelo polinomial de segundo orden para Dureza (Du), Adhesividad (Ad), Cohesividad (Coh), Gomosidad (Go) y Masticabilidad (Ma) (utilizando las variables del diseño codificadas) y estadísticos obtenidos a partir del análisis ANOVA de cada modelo, para el día 3 y 31 de almacenamiento de las leches fermentadas probióticas con colesterol reducido obtenidas para el caso de estudio 2 217

Tabla IV.37. Puntajes promedios para los descriptores de textura: Consistencia (Co), Cremosidad (Cre), Aspereza (Asp) y Astringencia (Ast) y variación porcentual ($V\%$), de las muestras de leches fermentadas probióticas con colesterol reducido evaluadas sensorialmente a los 3 y 31 días de vida útil para el caso de estudio 2 224

Tabla IV.38. Coeficientes de regresión del modelo polinomial de segundo orden para los descriptores de textura: Consistencia (Co) y Cremosidad (Cre) (utilizando las variables del diseño codificadas) a los 3 y 31 días de almacenamiento, para el caso de estudio 2 225

Tabla IV.39. Puntajes medios ponderados (Mp) y porcentajes percibidos (%Perc.) para los atributos de *flavor*: “crema”, “suero”, “leche en polvo” para las diferentes muestras ensayadas a los 3 y 31 días de almacenamiento, para el caso de estudio 2 229

Tabla IV.40. Puntajes medios ponderados (Mp) y porcentajes percibidos (% Perc.) para los atributos de *flavor*: “cocido”, “ácido”, “dulce” para las diferentes muestras ensayadas a los 3 y 31 días de almacenamiento, para el caso de estudio 2 232

Tabla IV.41. Puntaje promedio de los defectos hallados por el panel sensorial en función de las experiencias y el tiempo de almacenamiento, para el caso de estudio 2..... 234

Tabla IV.42. Lista de cepas aisladas, seleccionadas e identificadas a partir de productos comerciales, colección Scardovi (BUSCOB - UNIBO) y aquellos utilizados en los protocolos de elaboración de los casos de estudio 1 y 2 237

Tabla IV.43. Descripción de los sustratos utilizados en las fermentaciones..... 239

Tabla IV.44. Recuento de células viables ($\log \text{UFC.mL}^{-1}$) y porcentaje de supervivencia para lactobacilos y bifidobacterias a diferentes tiempos de exposición (15 y 90 min) a bajos pH (2,5) + enzima pepsina 246

Tabla IV.45. Recuento de células viables ($\log \text{UFC.mL}^{-1}$) y porcentaje de supervivencia para lactobacilos y bifidobacterias a diferentes tiempos de exposición (1 y 4 hs) a Bilis 2%..... 247

Tabla IV.46. Concentración inhibitoria mínima (CIM, $\mu\text{g.mL}^{-1}$) de varios antibióticos testeados para las cepas seleccionadas. Las cepas se caracterizaron como sensibles (S) o resistentes (R) de acuerdo a los puntos de corte definidos por la guía EFSA (2008) 248

Tabla IV.47. Viabilidad ($\log \text{UFC.g}^{-1}$) y porcentaje de supervivencia (%Sup.) de cepas de lactobacilos y bifidobacterias en leches fermentadas durante el almacenamiento y expuestas a condiciones gastrointestinales simuladas..... 250

Índice de figuras

Figura I.1. Consumo de productos lácteos en Kg/habitante/año en Argentina entre 1999 y 2009.	14
Figura I.2. Modelo de subunidades de la micela de caseína	18
Figura I.3. Modelo de doble unión de la micela de caseína.....	19
Figura I.4. Representación esquemática del glóbulo graso en leche	23
Figura I.5. Estructura química de la goma espina corona	36
Figura I.6. Estructura de ciclodextrinas.....	40
Figura I.7. Representación del proceso de homogeneización de la leche (a) y esquema del funcionamiento de un homogeneizador de dos etapas (b)	43
Figura I.8. Representación esquemática del complejo de inclusión colesterol/ β -CD en proporción 1:3	44
Figura I.9. Representación de un fluido newtoniano que fluye entre una placa inferior fija y, una superior móvil.....	48
Figura I.10. Curvas de fluidez (τ vs. $\dot{\gamma}^*$) para fluidos newtonianos y no newtonianos: pseudoplásticos, dilatantes, plástico de Bingham y plástico tipo Casson	51
Figura I.11. Comportamiento de los fluidos dependientes del tiempo.....	52
Figura I.12. Clasificación del comportamiento reológico de los fluidos.....	53
Figura I.13. Esquema de un viscosímetro de cilindros concéntricos. Rc: radio de la copa; Rb: radio del cilindro); h = altura del cilindro	55
Figura I.14. Curva de Análisis de Perfil de Textura típica obtenida con un Instron. Adhesividad: A3; Elasticidad: D2/D1; Cohesividad: A2/A1.....	61
Figura I.15. Modelo general de un proceso o sistema.....	67
Figura I.16. Representación geométrica de un diseño de Box-Behnken para tres factores (A, B, C).....	69
Figura III.1. Etapas del proceso de producción de leches fermentadas con colesterol reducido.....	81
Figura III.2. Reograma τ vs. $\dot{\gamma}$	90
Figura IV.1. Curvas de pH (azul) y acidez (verde) en función del tiempo de fermentación para la experiencia 10, del caso de estudio 1	112
Figura IV.2. Curvas de pH (azul) y dpH/dt (roja) en función del tiempo de fermentación (min) para las muestras 7 (a) y 10 (b), correspondientes a las leches fermentadas probióticas con colesterol reducido del caso de estudio 1	113

Figura IV.3. Gráficas de superficie de respuesta para: a) $V_{m\acute{a}x}$, b) $pH_{V_{m\acute{a}x}}$, c) $t_{V_{m\acute{a}x}}$, d) t_{fin} , en función de la concentración G y GEC, manteniendo constante AMM y en su nivel intermedio, para el caso de estudio 1.....	116
Figura IV.4. Evolución del pH durante el almacenamiento para las diferentes muestras de leches fermentadas, correspondientes al caso de estudio 1.....	119
Figura IV.5. Evolución de la acidez titulable durante el almacenamiento para las diferentes muestras de leches fermentadas, correspondientes al caso de estudio 1.....	119
Figura IV.6. Gráfico de la composición porcentual promedio para la muestra 1, correspondiente al caso de estudio 1. HU: humedad, ST: sólidos totales, CE: cenizas, GR: grasas, PT: proteína total, HC: hidratos de carbono.....	121
Figura IV.7. Gráfica de IRA% por centrifugación para las diferentes muestras de leches fermentadas en función del almacenamiento (días 3: azul, 17: rojo y 31: verde), para el caso de estudio 1.....	125
Figura IV.8. Gráfica del Log UFC.g ⁻¹ de <i>L. rhamnosus</i> Sp1vs. tiempo (3 y 31 días) para las diferentes muestras correspondientes al caso de estudio 1.....	127
Figura IV.9. Gráficas de superficie de respuesta (a) y líneas de contorno (b) para $K_{s\acute{d}ia3}$ en función de la concentración de G y GEC, manteniendo constante AMM y en su nivel intermedio, para el caso de estudio 1.....	132
Figura IV.10. Efecto de interacción entre factores $X_1.X_3$ (correspondientes a G y GEC, respectivamente) sobre $K_{s\acute{d}ia3}$, manteniendo constante AMM en su valor intermedio, para el caso de estudio 1. Negro: 0% GEC; rojo: 0,5% GEC.....	133
Figura IV.11. Gráficas de superficie de respuesta (a) y líneas de contorno (b) para $K_{s\acute{d}ia31}$ en función de la concentración de G y AMM, manteniendo constante GEC y en su nivel intermedio, para el caso de estudio 1.....	134
Figura IV.12. Gráficas de superficie de respuesta (a) y líneas de contorno (b) para $n_{s\acute{d}ia3}$ en función de la concentración de G y GEC, manteniendo constante AMM y en su nivel intermedio, para el caso de estudio 1.....	135
Figura IV.13. Gráficas de superficie de respuesta (a) y líneas de contorno (b) para $K_{id\acute{d}ia3}$, en función de la concentración de G y GEC, manteniendo AMM constante y en su nivel intermedio, para el caso de estudio 1.....	137
Figura IV.14. Gráficas de superficie de respuesta (a) y líneas de contorno (b) para $\mu_{ap50\acute{d}ia3}$, en función de la concentración de G y GEC, manteniendo AMM constante y en su nivel intermedio, para el caso de estudio 1.....	140
Figura IV.15. Reogramas de esfuerzo de corte (τ [Pa]) en función del gradiente de deformación ($\dot{\gamma}$ [s ⁻¹]) para el caso de estudio 1. (●): muestra 7 día 3; (○): muestra 7 día 3; (▲): muestra 13 día 3; (Δ): muestra 13 día 31.....	142
Figura IV.16. Gráficas de superficie de respuesta (a) y líneas de contorno (b) para $IT_{d\acute{d}ia3}$ en función de la concentración de G y GEC, manteniendo constante AMM y en su nivel intermedio, para el caso de estudio 1.....	143

Figura IV.17. Gráficas de superficie de respuesta (a) y líneas de contorno (b) para $A_{día3}$, en función de la concentración de G y GEC, manteniendo constante AMM y en su nivel intermedio, para el caso de estudio 1..... 146

Figura IV.18. Gráficas de superficie de respuesta (a) y líneas de contorno (b) para $B_{día3}$, en función de la concentración de G y AMM, manteniendo constante GEC y en su nivel intermedio, para el caso de estudio 1..... 147

Figura IV.19. Gráficas de superficie de respuesta (a) y líneas de contorno (b) para $Du_{día3}$ en función de la concentración de G y GEC, manteniendo constante AMM y en su nivel intermedio, para el caso de estudio 1..... 152

Figura IV.20. Gráficas de superficie de respuesta (a) y líneas de contorno (b) para $Ad_{día3}$, en función de la concentración de G y GEC, manteniendo constante AMM y en su nivel intermedio, para el caso de estudio 1..... 154

Figura IV.21. Elasticidad promedio para las experiencias del caso de estudio 1 en función del almacenamiento (día 3: azul y día 31: rojo)..... 155

Figura IV.22. Gráficas de superficie de respuesta (a) y líneas de contorno (b) para $Coh_{día3}$ en función de la concentración G y AMM, manteniendo constante GEC y en su nivel intermedio, para el caso de estudio 1..... 157

Figura IV.23. Gráficas de superficie de respuesta (a) y líneas de contorno (b) para $Go_{día3}$, en función de la concentración de G y GEC, manteniendo constante AMM y en su nivel intermedio, para el caso de estudio 1..... 158

Figura IV.24. Diagramas de araña para cada descriptor de textura: a) *Consistencia*, b) *Creмосidad*, c) *Aspereza*, d) *Astringencia* que comparan los puntajes asignados a cada muestra para dos tiempos de ensayo (día 3 y 31), para el caso de estudio 1 160

Figura IV.25. Gráficas de superficie de respuesta (a) y líneas de contorno (b) para $Co_{día3}$, en función de la concentración de G y GEC, manteniendo constante AMM y en su nivel intermedio, para el caso de estudio 1..... 164

Figura IV.26. Gráficas de superficie de respuesta (a) y líneas de contorno (b) para $Cre_{día3}$, en función de la concentración de G y AMM, manteniendo constante GEC y en su nivel intermedio, para el caso de estudio 1..... 165

Figura IV.27. Gráficas de superficie de respuesta (a) y líneas de contorno (b) para $Asp_{día3}$, en función de la concentración de G y GEC, manteniendo AMM constante en su nivel intermedio, para el caso de estudio 1..... 166

Figura IV.28. Gráficas de superficie de respuesta (a) y líneas de contorno (b) para $Asp_{día3}$, en función de la concentración de G y AMM, manteniendo constante GEC y en su nivel intermedio, para el caso de estudio 1..... 167

Figura IV.29. Gráficas de superficie de respuesta (a) y líneas de contorno (b) para $Ast_{día3}$, en función de la concentración de G y GEC, manteniendo constante AMM y en su nivel intermedio, para el caso de estudio 1..... 168

Figura IV.30. Gráficos de líneas para los promedios ponderados (negro día 3, verde día 31) y gráficos de barras para el porcentaje percibo (azul día 3, rojo día 31) de los descriptores de *flavor*: “crema” (a), “suero” (b) y “leche en polvo” de cada experimento en función del almacenamiento, para el caso de estudio 1..... 172

Figura IV.31. Gráficos de líneas para los promedios ponderados (negro día 3, verde día 31) y gráficos de barras para el porcentaje percibo (azul día 3, rojo día 31) de los descriptores de *flavor*: “cocido” (a), “ácido” (b) y “Dulce” (c) de cada experimento en función del almacenamiento, para el caso de estudio 1..... 175

Figura IV.32. Puntaje promedio de defectos encontrados en las leches fermentadas al día 31 de almacenamiento, para el caso de estudio 1. Ex: extraño; Vi: viejo, Me: metálico, Ra: rancio 178

Figura IV.33. Gráficas de superficie respuesta y líneas de contorno para la función Deseabilidad global de Derringer obtenida para la optimización simultánea de las variables (G, AMM y GEC) y las respuestas ($V_{máx}$, t_{fin} , $K_{sdía31}$, $A_{día31}$, $B_{día31}$, $Co_{día31}$, $Cre_{día31}$, $Asp_{día31}$, $Ast_{día31}$, $Du_{día31}$) en el caso de querer obtener un yogur tipo batido (a y c) o un yogur tipo firme (b y d) 181

Figura IV.34. Curvas de pH (azul) y acidez (verde) en función del tiempo de fermentación para la experiencia 2, del caso de estudio 2..... 185

Figura IV.35. Gráficas de superficie de respuesta (a) y líneas de contorno (b) para $V_{máx}$ en función de la concentración de CAL y CAS, para el caso de estudio 2..... 187

Figura V.36. Evolución del pH durante el almacenamiento para las diferentes muestras correspondientes al caso de estudio 2 191

Figura IV.37. Evolución de la acidez titulable (mol/L ácido láctico) durante el almacenamiento para las diferentes muestras correspondientes al caso de estudio 2 191

Figura IV.38. Gráfico de la composición porcentual promedio para la muestra 1, correspondiente al caso de estudio 2. HU: humedad, ST: sólidos totales, CE: cenizas, GR: grasas, PT: proteína total, HC: hidratos de carbono 193

Figura IV.39. Gráfica del Log UFC.g⁻¹ de *L. rhamnosus* Sp1 vs. tiempo (días 3 y 31) para las diferentes muestras correspondientes al caso de estudio 2..... 197

Figura IV.40. Gráficas de superficie de respuesta (a) y líneas de contorno (b) para $K_{sdía3}$ en función de la concentración de CAL y CAS, para el caso de estudio 2..... 201

Figura IV.41. Gráficas de superficie de respuesta (a) y líneas de contorno (b) para $n_{sdía3}$ en función de la concentración de CAL y CAS, para el caso de estudio 2..... 203

Figura IV.42. Gráficas de superficie de respuesta (a) y líneas de contorno (b) para $\mu_{ap50día3}$, en función de la concentración de CAL y CAS, para el caso de estudio 2..... 206

Figura IV.43. Efecto de interacción entre factores CAL y CAS sobre $\mu_{ap50día3}$, para el caso de estudio 2. Negro: 0,076% CAS; rojo: 0,764% CAS..... 206

Figura IV.44. Reograma de esfuerzo de corte (τ) en función del gradiente de deformación (γ') correspondiente a las muestras 1 y 9 durante el almacenamiento, para el caso de estudio 2. (●): muestra 1 día 24, (□): muestra 1 día 3, (◇): muestra 9 día 24 y (▲): muestra 9 día 3	207
Figura IV.45. Gráficas de superficie de respuesta para $IT_{día3}$ (a) e $IT_{día31}$ (b) en función de la concentración de CAL y CAS, para el caso de estudio 2	208
Figura IV.46. Reograma de esfuerzo de corte (τ , Pa) en función del tiempo de cizallamiento (s) para las muestras 4 y 5 en función del almacenamiento, correspondientes al caso de estudio 2. (▲): muestra 4 día 3; (□): muestra 5 día 3; (◇): muestra 4 día 31; (●): muestra 5 día 31.....	210
Figura IV.47. Gráficas de superficie de respuesta y líneas de contorno para $A_{día3}$ (a y c) y $A_{día31}$ (b y d) en función de la concentración de CAL y CAS, para el caso de estudio 2	211
Figura IV.48. Efecto de interacción (a) y no interacción (b) entre variables para $A_{día3}$ y $A_{día31}$, respectivamente, para el caso de estudio 2	212
Figura IV.49. Gráficas de superficie de respuesta (a) y líneas de contorno (b) para $B_{día3}$, en función de la concentración de CAL y CAS, para el caso de estudio 2.....	213
Figura IV.50. Curvas de Perfil de Textura obtenidas para las muestras 5 (◇) y 7(▲) al día 3 de almacenamiento, correspondiente al caso de estudio 2.....	214
Figura IV.51. Gráficas de superficie de respuesta y líneas de contorno para $Du_{día3}$ (a y c) y $Du_{día31}$ (b y d) en función de la concentración de CAL y CAS, para el caso de estudio 2	218
Figura IV.52. Gráficas de superficie de respuesta (a) y líneas de contorno (b) para $Ad_{día3}$ en función de la concentración de CAL y CAS, para el caso de estudio 2.....	220
Figura IV.53. Gráficas de superficie de respuesta (a) y líneas de contorno (b) para $Coh_{día3}$ en función de la concentración de CAL y CAS, para el caso de estudio 2.....	221
Figura IV.54. Gráficas de superficie de respuesta (a) y líneas de contorno (b) para $Coh_{día3}$ en función de la concentración de CAL y CAS, para el caso de estudio 2.....	222
Figura IV.55. Gráficas de superficie de respuesta (a) y líneas de contorno (b) para $Co_{día3}$ en función de la concentración de CAL y CAS, para el caso de estudio 2	225
Figura IV.56. Gráficas de superficie de respuesta (a) y líneas de contorno (b) para $Cre_{día3}$, en función de la concentración de CAL y CAS, para el caso de estudio 2.....	226
Figura IV.57. Diagramas de araña para cada descriptor de textura: a) <i>Consistencia</i> , b) <i>Creмосidad</i> , c) <i>Aspereza</i> , d) <i>Astringencia</i> que comparan los puntajes asignados a cada muestra durante el almacenamiento, para el caso de estudio 2	227
Figura IV.58. Gráficos de líneas para los promedios ponderados (negro: día 3, verde: día 31) y gráficos de barras para el porcentaje percibido (azul día 3, rojo día 31) de los descriptores de <i>flavor</i> : “ <i>crema</i> ” (a), “ <i>suero</i> ” (b) y “ <i>leche en polvo</i> ” (c) de cada experiencia en función del almacenamiento para el caso de estudio 2	230

Figura IV.59. Gráficos de líneas para los promedios ponderados (negro día 3, verde día 31) y gráficos de barras para el porcentaje percibido (azul día 3, rojo día 31) de los descriptores de <i>flavor</i> : “cocido” (a), “ácido” (b) y “dulce” (c) de cada experiencia en función del almacenamiento, para el caso de estudio 2	233
Figura IV.60. Promedio acumulado de los defectos encontrados al día 31, para las diferentes muestras que conforman el caso de estudio 2	235
Figura IV.61. Cambios de pH del medio TPY-modificado adicionado con: a) Glucosa (control positivo), b) Raftiline (RAF), c) Inulina (BEN), d) Fructooligosacárido (FOS) para diferentes bifidobacterias entre los días 0 (azul), 2 (rojo) y 5 (verde). Valores de pH final debajo de 5,2 indican reacción positiva	241
Figura IV.62. Cambios de pH del medio TPY-modificado adicionado con: a) Galactooligosacárido (GOS), b) Almidón modificado de mandioca (AMM), c) Gelatina (G), d) Goma espina corona (GEC) para diferentes bifidobacterias entre los días 0 (azul), 2 (rojo) y 5 (verde). Valores de pH final debajo de 5,2 indican reacción positiva.....	242
Figura IV.63. Cambios de pH del medio MRS-modificado adicionado con: a) Glucosa (GLU, control positivo), b) Raftiline (RAF), c) Inulina (BEN), d) Fructooligosacárido (FOS) para diferentes lactobacilos y starter entre los días 0 (azul), 2 (rojo) y 5 (verde). Valores de pH final debajo de 5,2 indican reacción positiva	243
Figura IV.64. Cambios de pH del medio MRS-modificado adicionado con: a) Galactooligosacárido (GOS), b) Almidón modificado de mandioca (AMM), c) Gelatina (G), d) Goma espina corona (GEC) para diferentes lactobacilos y starter entre los días 0 (azul), 2 (rojo) y 5 (verde). Valores de pH final debajo de 5,2 indican reacción positiva.....	244
Figura IV.65. Supervivencia de cepas de lactobacilos y bifidobacterias a pH 2,5 + pepsina.....	246
Figura IV.66. Supervivencia de cepas de lactobacilos y bifidobacterias a Bilis 2%.....	247
Figura IV.67. Porcentaje de supervivencia a condiciones gastrointestinales simuladas de cepas probióticas adicionadas a leches fermentadas durante el almacenamiento (5 y 31 días)	251

Abreviaturas y símbolos

<i>%Perc.</i>	Porcentaje percibido
τ_0	Límite de fluencia
μ	Viscosidad verdadera
<i>A</i>	Resistencia máxima inicial
<i>Ad</i>	Adhesividad
<i>AF</i>	Alimento funcional
<i>AGS</i>	Ácido graso saturado
<i>AMM</i>	Almidón modificado de mandioca
<i>APT</i>	Análisis perfil de textura
<i>Asp</i>	Aspereza
<i>Ast</i>	Astringencia
a_w	Actividad de agua
<i>B</i>	Coefficiente de ruptura tixotrópica
<i>BAL</i>	Bacterias ácido lácticas
<i>BEN</i>	Inulina Beneo
<i>CAL</i>	Calcio
<i>CAS</i>	Caseína
<i>CD</i>	Ciclodextrina
<i>CE</i>	Cenizas
<i>CIM</i>	Concentración inhibitoria mínima
<i>CLA</i>	Ácido linoleico conjugado
<i>Co</i>	Consistencia sensorial
<i>Coh</i>	Cohesividad
<i>Cre</i>	Creosidad
<i>DO</i>	Densidad óptica
<i>Du</i>	Dureza
<i>ECV</i>	Enfermedad cardiovascular
<i>El</i>	Elasticidad
<i>FOS</i>	Fructooligosacárido
<i>G</i>	Gelatina
<i>GEC</i>	Goma Espina Corona
<i>GG</i>	Glóbulo graso
<i>GLU</i>	Glucosa
<i>Go</i>	Gomosidad
<i>GOS</i>	Galactooligosacárido
<i>GT</i>	Grasa total
<i>HDL</i>	Lipoproteína de alta densidad
<i>IDL</i>	Lipoproteína de densidad intermedia
<i>IRA</i>	Índice de retención de agua
<i>IT</i>	Índice de tixotropía
<i>K</i>	Índice de consistencia
K_i	Índice de consistencia curva inferior del reograma
K_s	Índice de consistencia curva superior del reograma
<i>LDL</i>	Lipoproteína de baja densidad
<i>LF</i>	Leche fermentada
<i>LPD</i>	Leche en polvo descremada
<i>LPE</i>	Leche en polvo entera

<i>Ma</i>	Masticabilidad
<i>Mp</i>	Media pondera
<i>MSR</i>	Metodología superficie de respuesta
<i>n</i>	Índice de comportamiento
<i>n_i</i>	Índice de comportamiento curva inferior del reograma
<i>n_s</i>	Índice de comportamiento curva superior del reograma
<i>pH_{Vmáx}</i>	pH a la velocidad máxima de acidificación
<i>PT</i>	Proteína total
<i>RAF</i>	Inulina Raftiline
<i>ST</i>	Sólidos totales
<i>t_{fin}</i>	Tiempo que tarda en llegar al final de la fermentación
<i>t_{Vmáx}</i>	Tiempo que tarda en llegar a la velocidad máxima de acidificación
<i>V%</i>	Variación porcentual
<i>VB</i>	Valor biológico
<i>VLDL</i>	Lipoproteína de muy baja densidad
<i>V_{máx}</i>	Velocidad máxima de acidificación
<i>WPC</i>	Concentrado de proteínas de suero
<i>β-CD</i>	Betaciclodextrina
<i>β-CD</i>	Beta-ciclodextrina
<i>γ*</i>	Gradiente de deformación
<i>μ_{ap}</i>	Viscosidad aparente
<i>μ_{ap50}</i>	Viscosidad aparente a gradiente de deformación 50 s ⁻¹
<i>τ</i>	Esfuerzo de corte

RESUMEN

Hoy en día, existe una creciente demanda en el mercado de productos libres o bajos en contenido de grasa. Esto se encuentra relacionado con el hecho que la grasa láctea tiene ácidos grasos saturados (AGS) y colesterol que han sido asociados con el desarrollo de enfermedades cardíacas coronarias. Mientras que no todos los AGS poseen idéntica potencialidad hipercolesterolémica, algunos son considerados que no presentan dicha característica, siendo que también el colesterol puede generar, mediante exposición al calor y radiación, miles de compuestos oxidados (COPs) que son aterogénicos y carcinogénicos.

La remoción parcial o total de la grasa de los productos lácteos disminuye la aceptabilidad global percibida por los consumidores, además de impedirse el aporte de ácidos grasos esenciales y vitaminas liposolubles asociados a la misma. Es por ello, que es deseable extraer sólo el colesterol, sin remover la grasa láctea. La Beta-ciclodextrina se propone como una alternativa para extraer el colesterol con un rendimiento cercano al 90%.

Por su parte los hidrocoloides juegan un rol importante en la aceptabilidad de los productos, ya que aumentan la estabilidad física de los mismos y las propiedades de *mouthfeel* (sensación en boca). Existe un mercado sustancial para nuevas gomas que sustituyan varios de los hidrocoloides importados por un mejor precio, funcionalidad adecuada o para complementar y generar sinergias que mejoren las propiedades texturales y reológicas de los productos. Específicamente, la goma espina corona (GEC), es una galactomanano extraído de las semillas de *Gleditsia amorphoides*, una árbol leguminoso que crece en América Latina. Debido a su similitud con la goma guar y garrofín, algunos autores consideran que podría reemplazar a esta última (que son importadas).

Por otro lado, tradicionalmente en la producción de leches fermentadas, el contenido de sólidos de la leche es incrementado mediante el agregado de leche en polvo descremada (LPD) y/o concentrado de proteínas de suero (en inglés: WPC). Se ha demostrado que el agregado de estos ingredientes tiende a aumentar la firmeza y viscosidad del producto, y a su vez reducir la sinéresis (separación de suero en la superficie), defecto frecuentemente encontrado en leches fermentadas y que produce sensación de desagrado y rechazo en el consumidor. Además, las

proteínas de suero aumentan la concentración de aminoácidos esenciales en el producto, ya que poseen un valor biológico 50 % mayor que las propias caseínas de la leche. Sin embargo, la relación óptima (LPD/WPC) en que estos aditivos deben adicionarse depende de las características físicas deseadas, siendo objeto de estudio.

Los consumidores prefieren cada vez más alimentos con valor nutricional agregado naturalmente, más que consumir suplementos nutricionales para poder alcanzar los requerimientos diarios de nutrientes, como el calcio, entre otros. De esta manera, las leches fermentadas se plantean como uno de los mejores vehículos para ayudar a combatir la deficiencia de este mineral.

Además la presencia de microorganismos probióticos en alimentos ha sido tradicionalmente asociada con ciertos beneficios a la salud. Sin embargo, los probióticos deben mantenerse en un número adecuado en los productos formulados para poder posteriormente llegar en concentraciones adecuadas al tracto gastrointestinal y a su vez sobrevivir a la condiciones de bajo pH y concentración de sales biliares que existen dentro del mismo.

El objetivo de la siguiente tesis fue por un lado, producir y evaluar (físicoquímica, reológica, textural y sensorialmente) leches fermentadas probióticas con colesterol reducido, adicionadas con hidrocoloides nacionales (gelatina, almidón modificado de mandioca y espina corona) o modificando su contenido en calcio y caseína. Además, se evaluó la capacidad fermentativa de sustratos prebióticos y aditivos espesantes y la supervivencia a diferentes condiciones simuladas gastrointestinales de diferentes cepas aisladas de productos del mercado europeo y otras provenientes de una colección propia de la Universidad de Bologna. Los microorganismos que mostraron mejores aptitudes se inocularon en una matriz láctea para evaluar también su supervivencia.

Los resultados mostraron que fue posible remover eficientemente el colesterol de la leche (porcentaje de extracción superior a 85%) utilizando betaciclodextrina y el recuento de microorganismo probiótico fue siempre superior a 7 log UFC/g.

Para ambos casos de estudio, se logró caracterizar la composición química de las muestras obtenidas, según los diseños adoptados en cada caso y obtener coágulos de gran estabilidad (sinéresis mínima) cuanto mayor fue el contenido de las variables en estudio. Se conservaron adecuadamente las características

organolépticas y los defectos sensoriales encontrados fueron calificados como “apenas perceptibles” en la mayoría de las experiencias.

En el caso del estudio con hidrocoloides, se comprobó que la gelatina afecta principalmente las características reológicas, mientras que la goma espina corona influye más sobre las propiedades sensoriales de los productos. El almidón modificado de mandioca parece no tener influencia estadísticamente significativa sobre las características estudiadas. La gelatina gobierna la consistencia, viscosidad y tixotropía de las leches fermentadas, y las aleja más del comportamiento newtoniano ($n=1$). La goma espina corona enmascara la aspereza y astringencia, y genera productos con mayor cremosidad. A su vez, la sinéresis se vio reducida cuanto mayor era el contenido de estos hidrocoloides.

Por su parte, el agregado de calcio y caseína aumentó la consistencia y viscosidad de las leches fermentadas debido a una mayor asociación del calcio con las micelas de caseína y entre ellas. Así mismo, parámetros como dureza y adhesividad estuvieron asociados directamente con el contenido del mineral.

Por otro lado, la goma espina corona fue el único aditivo espesante que pudo ser utilizados por algunas cepas de bifidobacterias, mientras que la gelatina y el almidón modificado de mandioca no fueron metabolizados por ningún microorganismo. De los compuestos prebióticos comerciales ensayados GOS y FOS fueron los sustratos más utilizados. De las especies testeadas en los ensayos de supervivencia a condiciones gastrointestinales, resistencia a antibiótico y viabilidad en la matriz láctea, se determinó que *B. animalis* ssp. *lactis* MB29 (proveniente de la Colección Scardovi de la Universidad de Bologna) fue la que mejores aptitudes mostró tener frente a los parámetros estudiados.

Desde un punto de vista económico, sensorial y textural la goma espina corona tiene el potencial de transformarse en una importante goma comercial como nuevo hidrocoloide para utilizar en productos lácteos con un precio mucho menor.

ABSTRACT

Today, there is a growing demand in the market for free or low -fat products. This is related to the fact that the milk fat has saturated fatty acids and cholesterol that have been associated with the development of coronary heart disease. While not all saturated fatty acids have identical hypercholesterolemic power, cholesterol can generate , by exposure to heat and radiation, many compounds which are atherogenic oxidized and carcinogenic .

Partial or total removal of fat from dairy products decreases the perceived overall acceptability by consumers. Therefore, it is desirable to extract only the cholesterol without milk fat removal. The Beta-cyclodextrin was suggested as an alternative to extracting the cholesterol with a yield close to 90%.

Hydrocolloids play an important role in the acceptability of the products because they increase the physical stability and mouthfeel properties. There is a substantial market for new gums to replace some of the imported for a better price, or adequate functionality to complement and create synergies that will improve the textural and rheological properties of the products hydrocolloids. Specifically, the espina corona gum is a galactomannan extracted from the seeds of *Gleditsia amorphoides* a leguminous tree that grows in Latin America. Because of its similarity to the guar gum and locust bean gum, some authors consider that could replace them (which are imported).

Furthermore, traditionally in the production of fermented milk products, the solids content of milk is increased by adding skim milk powder (SMP) and/or whey protein concentrate (WPC). It has been shown that the addition of these ingredients tends to increase the firmness and viscosity of the product, and in turn reduces syneresis (serum separation surface) defects often found in fermented milk. Also, whey protein increases the concentration of essential amino acids in the product, and has a biological value 50 % higher than milk caseins. However, the optimal ratio (SMP / WPC) in which these additives should be added depends on the desired physical characteristics being studied.

Consumers increasingly prefer food with nutritional value naturally added more to consume nutritional supplements to meet the daily requirements of

nutrients, such as calcium, among others. Thus, fermented milks are presented as one of the best vehicles to help combat the deficiency of this mineral.

Besides, the presence of probiotic microorganisms in food has traditionally been associated with certain health benefits. However, probiotics should be kept in a suitable amount in formulated products for later arrive at appropriate concentrations to the gastrointestinal tract and in turn survive the conditions of low pH and concentration of bile salts that exist within it.

The aims of the thesis were on one side, produce and evaluate (physicochemical, rheological and sensory) probiotic cholesterol-reduced fermented milks, added with hydrocolloids (gelatin, cassava modified starch and espina corona gum) or modifying its calcium and casein content. In addition, the fermentative capacity of prebiotic substrates and thickening additives and survival at different simulated gastrointestinal conditions of different isolates of products on the European market and others from their own collection of the University of Bologna was evaluated. Microorganisms were inoculated showed better skills in a dairy matrix to also assess their survival.

The results showed that it was possible to efficiently remove cholesterol from milk (yield extraction more than 85%) with beta-cyclodextrin and probiotic microorganism counts were always higher than 7 log CFU / g.

For both case studies (different hydrocolloids and calcium-casein contents), it was possible to characterize the chemical composition of the samples obtained according to the designs adopted in each case and gets clot stability (low syneresis) as the higher was the content of the study variables. Adequately preserved the organoleptic characteristics and the sensory defects found were rated as "barely perceptible" in most of the experiences.

For the study of hydrocolloids, gelatin was verified that it mainly affects the rheological properties, while espina corona gum affects more on the sensory properties of products. The modified cassava starch appears to have no significant influence on the characteristics studied. Gelatin governs consistency, viscosity and thixotropy of fermented milks. Espina corona gum masks the grittiness and astringency, and generates products with more creaminess. This in turn was reduced syneresis the higher the content of these hydrocolloids.

Meanwhile, the addition of calcium and casein increased consistency and viscosity of the fermented milk products due to higher calcium association with the casein micelles and between them. Furthermore, parameters such as hardness and adhesiveness were associated directly with the mineral content.

Furthermore, espina corona gum was the only thickening additive that could be used by some strains of bifidobacteria while gelatin and modified cassava starch were not metabolized by any microorganism. Commercial prebiotic GOS and FOS compounds tested were the most commonly used substrates. For species tested in survival assays gastrointestinal conditions, antibiotic resistance and viability in the milk matrix, *B. animalis* ssp. *lactis* MB29 (Scardovi Collection) showed to have better skills that assemble the parameters studied.

From an economic, sensory and textural view espina corona gum has the potential to become an important commercial gum like new hydrocolloid for use in dairy products with a much lower price.

Capítulo I

Introducción

I.1. ALIMENTOS FUNCIONALES.

I.1.1. DIETA Y SALUD ¿POR QUÉ Y CÓMO SURGEN LOS ALIMENTOS FUNCIONALES?

Durante los últimos años la percepción que la industria y el consumidor tenían de los alimentos se ha modificado sustancialmente. La “*nutrición adecuada*”, entendida como “suficiente” y dirigida a evitar déficits, ha dejado de ser la meta en las sociedades desarrolladas. Emerge la concepción de la alimentación como “*nutrición óptima*”, es decir, aquella que no sólo aporta las necesidades energéticas y nutricionales básicas, sino que también proporciona beneficios fisiológicos adicionales. La nutrición adquiere un nuevo enfoque terapéutico y preventivo, participando en la promoción de la salud (Silveira-Rodríguez y col., 2003). A este cambio de actitud frente a la alimentación han contribuido los siguientes factores, entre otros (Gómez Romero, 2010):

- Creciente interés por el binomio alimento/salud debido a los estudios que demuestran que una dieta sana y equilibrada puede prevenir la aparición de ciertas enfermedades crónicas. El ritmo de vida actual y la falta de tiempo para cocinar han provocado que muchas personas abandonen determinados hábitos de alimentación saludables y, por tanto, que no ingieran todos los nutrientes que necesitan o las cantidades adecuadas. Esto ha generado un mayor interés por conocer los ingredientes que componen los alimentos y la energía que aportan sobre todo para personas con obesidad, con colesterol, diabéticos, celíacos, etc.
- Desarrollo de nuevas tecnologías que posibilitan el diseño y elaboración de nuevos productos alimentarios seguros y saludables, con un valor añadido para el consumidor.
- Aumento paulatino de la esperanza de vida con el consiguiente envejecimiento de la población mundial. Aunque la tercera edad requiere una menor contribución energética, necesita mantener su ingesta en nutrientes y demanda de alimentos con mayor contenido nutricional y de mayor digestibilidad.

En este contexto surgen los **alimentos funcionales** (AF), concepto que como tal surgió en Japón a finales de los años 80, ya que debido al incremento gradual de ciertas enfermedades relacionadas con el estilo de vida, la población comenzó a darse cuenta de la importancia de mantener y mejorar su salud y el gobierno tomó conciencia de los

costes sanitarios generados por la mayor esperanza de vida de la población anciana (Ohama y col., 2006). En 1991, el Ministerio de Salud y Bienestar de ese país fue pionero en publicar una reglamentación permitiendo legalmente la comercialización de algunos alimentos funcionales en términos de “alimentos para uso específico en salud”.

I.1.2. CONCEPTO DE ALIMENTO FUNCIONAL.

En la actualidad, no existe un concepto consensuado científica y universalmente para los AF. Las discrepancias existentes entre los países se deben principalmente a las diferencias culturales, las situaciones de mercado o la diferente manera de entender la nutrición (Kwak y Jukes, 2001). En Argentina, dado que existe un vacío legal en la materia, ya que los alimentos funcionales no están contemplados en el Código Alimentario Argentino, el Instituto Nacional de Alimentos (INAL) ha organizado un grupo de trabajo orientado a proponer normativa respecto a esta cuestión. La comisión realiza un relevamiento de la legislación internacional para sancionar una norma que permita la unificación de criterios. En base a esto, el concepto más aceptado en la actualidad es el elaborado por el International Life Science Institute (ILSI), donde define: *“un alimento puede considerarse funcional cuando se demuestra adecuadamente que, además de sus efectos nutritivos, afecta beneficiosamente a una o más funciones del organismo de forma que mejora su estado de salud o bienestar, reduce el riesgo de enfermedad o ambas cosas”* (Ashwell, 2004). Los AF deben seguir siendo alimentos, y deben demostrar sus efectos en las cantidades en que normalmente se consumen en la dieta. No se trata de comprimidos ni cápsulas, sino de alimentos que forman parte de un régimen normal. Por lo tanto, desde el punto de vista práctico, un alimento funcional puede ser:

- Un alimento natural en el que uno de sus componentes ha sido mejorado mediante condiciones especiales de cultivo.
- Un alimento al que se ha añadido un componente para que produzca beneficios (por ejemplo: bacterias probióticas seleccionadas, de probados efectos beneficiosos sobre la salud intestinal).
- Un alimento del cual se ha eliminado un componente para que produzca menos efectos adversos sobre la salud (por ejemplo: sin colesterol).

- Un alimento en el que la naturaleza de uno o más de sus componentes ha sido modificada químicamente para mejorar la salud (por ejemplo: los hidrolizados proteicos adicionados en los preparados para lactantes para reducir el riesgo de alergenidad).
- Un alimento en el que la biodisponibilidad de uno o más de sus componentes ha sido aumentada para mejorar la asimilación de un componente beneficioso.
- Cualquier combinación de las posibilidades anteriores (Ashwell, 2004).

I.1.3. TIPOS DE ALIMENTOS FUNCIONALES.

La ciencia de los AF se basa en la forma en que los nutrientes específicos y los componentes alimentarios afectan positivamente a las funciones selectivas (respuestas biológicas) del organismo. Se pueden identificar las siguientes áreas de la fisiología humana que se relacionan con la ciencia de los alimentos funcionales, a saber (Ashwell, 2004):

1. Crecimiento y desarrollo.
2. Regulación de los procesos metabólicos básicos.
3. Defensa contra el estrés oxidativo.
4. Fisiología cardiovascular.
5. Fisiología gastrointestinal.

A continuación se describirán brevemente aquellos que conciernen al desarrollo de este trabajo.

I.1.3.1. Alimentos funcionales adicionados con calcio.

I.1.3.1.1. Osteoporosis y Calcio.

Se entiende por **Osteoporosis** a la “*enfermedad esquelética sistémica, caracterizada por baja masa ósea y deterioro de la microestructura del tejido óseo, con el consecuente incremento en la fragilidad ósea y la susceptibilidad a las fracturas*” (definición aprobada en el Consenso realizado en Hong Kong, en el año 1993). El contenido mineral óseo depende del pico mineral óseo alcanzado, en el cual a su vez influyen el tipo de alimentación realizada, el estilo de vida, hábitos y la influencia genética. Esta patología constituye un problema de salud muy frecuente en las mujeres, principalmente las mujeres post-menopáusicas y en hombres después de los 50-60 años de edad (Torresani y Somoza, 2007).

La osteoporosis es una enfermedad que generalmente se manifiesta en las etapas tardías de la vida y que tiene sus orígenes en los períodos temprano del crecimiento

esquelético y de la acumulación de la masa ósea máxima. La alimentación de las madres durante el embarazo y la lactancia así como la del lactante y el niño pequeño tiene gran importancia biológica (Ashwell, 2004).

El calcio es un nutriente esencial debido a que participa de diversas funciones biológicas como la conducción nerviosa, contracción muscular, adhesión celular, mitosis, coagulación de glóbulos rojos y como soporte estructural de los huesos. Por otra parte, se vio que la ingesta de calcio reduce los riesgos de contraer enfermedades crónicas como la osteoporosis e hipertensión, entre otras (Miller y col., 2001).

Varios estudios científicos han demostrado que la alta ingesta de calcio dietético y su biodisponibilidad se asocian con la reducción del riesgo de osteoporosis, hipertensión, cáncer de colon, cálculos renales, accidentes cerebrovasculares, obesidad, absorción de plomo y síndrome premenstrual (Gurmeet y Kasiviswanathan, 2008).

Además, desde hace algunos años, existe creciente evidencia que apoya la relación entre el incremento de la ingesta de calcio y la reducción en el peso corporal, específicamente del tejido graso y del impactante papel que éste puede jugar en la regulación del metabolismo energético, modulando el riesgo de sobrepeso y obesidad (García-Lorda y col., 2005; Brito, 2009).

El calcio que proviene de los productos lácteos es más fácilmente absorbido por el intestino que el calcio que se encuentra en vegetales y cereales. Esto facilita la adición de este mineral en matrices que son ideales, como es el caso de las leches fermentadas (LF). Así mismo, la biodisponibilidad del calcio en las LF es incluso mayor que la de la leche (Singh y Muthukumarappan, 2007). La solubilidad está fuertemente influida por el pH del sistema, ya que el pH ácido del yogur ioniza el calcio, lo cual facilita su absorción intestinal y también reduce el efecto inhibidor de los fitatos, que acomplejan el calcio y disminuyen su biodisponibilidad, por estar en la forma de ácido fítico (no iónico, sin carga con efecto acomplejante) (Gurmeet y Kasiviswanathan, 2008). Los efectos del calcio son mayores cuando se lo consume en forma de un producto lácteo en vez de suplemento de calcio dietario (García-Lorda y col., 2005).

1.1.3.2. Alimentos funcionales para promover la salud cardiovascular.

1.1.3.2.1. Enfermedades cardiovasculares.

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son un grupo de enfermedades degenerativas de todo el sistema cardiovascular, que incluye la cardiopatía isquémica, la enfermedad de las arterias periféricas y el accidente cerebrovascular. La cardiopatía

isquémica constituye un importante problema de salud en la mayoría de los países industrializados. Sus síntomas clínicos predominantes son el infarto del miocardio (ataque cardíaco), la angina de pecho y la muerte cardíaca súbita, como consecuencia del angostamiento, causado por la aterosclerosis, de las arterias que suministran sangre al corazón (Ashwell, 2004).

Es preciso conocer los diversos factores de riesgo de enfermedad cardiovascular para entender el papel que pueden desempeñar los alimentos funcionales en su prevención. Hipertensión arterial, obesidad, diabetes, tabaquismo, elevados niveles de colesterol, predisposición genética, entre otros, se sitúan entre los principales factores de riesgo (Ashwell, 2004). Por su parte, el colesterol elevado es un componente clave en el desarrollo de ECV. Explica el 18% de la enfermedad cerebrovascular y 59% de la enfermedad coronaria, explicando el aproximadamente el 8% de todas las muertes (Ministerio de Salud de la Nación, 2006).

Los ácidos grasos (AG) alimentarios influyen en los niveles de lípidos sanguíneos. Esta influencia suele estar relacionada con su tamaño, forma y con el grado de saturación de sus cadenas hidrocarbonadas. De esta manera, durante años se sostuvo que es preferible evitar el consumo de AG saturados (AGS) y del tipo trans insaturados a los que se les atribuye el aumento de las concentraciones plasmáticas de LDL-colesterol (comúnmente denominado “colesterol malo”) y aumentar el consumo de AG insaturados (cis) y poliinsaturados (como los omega-3) que reducen las concentraciones de LDL-colesterol (Ashwell, 2004).

Sin embargo, más adelante se verá que varias de las afirmaciones realizadas sobre el consumo de AGS y su relación con las ECV han sido refutadas por numerosos investigadores (Parodi, 2009).

Se ha generado un gran mercado de los alimentos sin grasa, reducidos en colesterol o enriquecidos con AG insaturados para disminuir el riesgo de enfermedad cardiovascular (Ashwell, 2004).

I.1.3.3. Alimentos funcionales para promover la salud gastrointestinal.

I.1.3.3.1. Probióticos, prebióticos y simbióticos.

Hay pruebas crecientes de que las formas de vida moderna (los hábitos alimentarios, la utilización de antibióticos y el estrés) pueden comprometer el bienestar y la función gastrointestinal, y que ello se relaciona con los trastornos en la composición y función de la microflora.

La microflora intestinal constituye una barrera protectora que previene que bacterias nocivas invadan el tracto gastrointestinal. Cumple también una función importante al establecer, desde muy temprana edad, un sistema inmunitario en el que la resistencia a la infección y la tolerancia a los antígenos están equilibradas.

Tres estrategias alimentarias promueven el mantenimiento de un equilibrio más saludable de la microflora intestinal. Se basan en la utilización de probióticos, prebióticos y simbióticos, y todos ellos ofrecen grandes posibilidades como componentes alimentarios funcionales. En las definiciones de los tres va implícita la alteración beneficiosa de la composición de la microflora, que suele obtenerse mediante el incremento de las cantidades de bifidobacterias, de lactobacilos, o de ambos.

Con objeto de aumentar o reemplazar la cantidad de organismos de las especies habituales de la microflora, en las prácticas médica y veterinaria suelen administrarse suplementos alimenticios que contienen bacterias de comprobadas propiedades saludables. Estos suplementos se denominan probióticos. Por definición, un **probiótico** *es un ingrediente alimentario microbiano vivo que, ingerido en cantidades suficientes, produce efectos benéficos en la salud del consumidor.* Al actuar en forma directa e indirecta mediante interacciones con la microflora intestinal, los probióticos pueden beneficiar tanto a las personas sanas como a las que tienen problemas médicos.

Un **prebiótico** *es un ingrediente alimenticio no digerible que produce efectos beneficiosos al estimular selectivamente el crecimiento o modificar la actividad metabólica de una o varias especies bacterianas del colon, mejorando en consecuencia la salud del huésped.* Un **simbiótico** *es una mezcla de probióticos y prebióticos tendiente a aumentar la supervivencia de las bacterias que favorecen la salud, con el objetivo último de modificar la flora intestinal y su metabolismo* (Ashwell, 2004).

I.1.3.4. Alimentos adicionados de aminoácidos esenciales.

I.1.3.4.1. Proteínas de suero lácteo.

El agregado de proteínas de suero lácteo a éste tipo de productos, potencia las características nutricionales ya que posee un elevado número de aminoácidos esenciales, lo que le imparte un valor biológico mayor que las proteínas del huevo y la caseína de la leche (Spreer, 1991).

Las proteínas lácteas son reconocidas por tener propiedades nutricionales, funcionales y biológicas que hacen de ellas ingredientes importantes, en alimentos funcionales promotores de la salud. Estas propiedades son parcialmente atribuidas a los

péptidos bioactivos (Torres Llanez y col., 2005). Los péptidos bioactivos son secuencias de aminoácidos de pequeño tamaño, entre 2 y 15 residuos, inactivos dentro de la proteína intacta, que pueden ser liberados adecuadamente durante la digestión del alimento en el organismo o por un procesado previo. Estos péptidos tendrían efectos beneficiosos para el organismo en diversos casos (Vioque y col., 2000). Una vez en el intestino, estos péptidos pueden actuar localmente o pasar a través de la pared intestinal a la circulación sanguínea y alcanzar los órganos, con la subsiguiente regulación fisiológica. Algunos presentan propiedades opiáceas que inducirían el sueño, otros reducen la presión sanguínea (Walstra y Jenness, 2006), pueden proteger contra varias infecciones virales estimulando al sistema inmune y también se ha mostrado que éstas actúan en la prevención del cáncer de colon (Huginin, 2008). En otros trabajos se mencionan funciones antimicrobianas, antitrombóticas, como transportadores de calcio, factores de crecimiento, inductores hormonales y neurotransmisores (Vioque y col., 2000; Baró y col., 2001; Torres Llanez y col., 2005).

Las investigaciones realizadas sobre péptidos bioactivos en productos lácteos y derivados indican que, aunque el mecanismo fisiológico de estos péptidos aún no es claro, ofrecen un gran potencial para el desarrollo de alimentos funcionales y que la fermentación microbiana es una tecnología aplicable para la producción de los mismos (Torres Llanez y col., 2005).

En el desarrollo de este trabajo focalizaremos en los aspectos anteriormente mencionados que pueden dar lugar a que un alimento adquiriera la categoría de funcional, como son el agregado de microorganismos probióticos, la fortificación con calcio, agregado de aminoácidos esenciales a través de la utilización de proteínas de suero lácteo y la reducción del contenido en colesterol en leches fermentadas.

I.1.4. REGULACIÓN DE ALIMENTOS FUNCIONALES.

El número de productos funcionales que los consumidores pueden adquirir en el mercado ha ido creciendo de forma apreciable a lo largo de los últimos años. Sin embargo, la evidencia científica, avalada por estudios rigurosos y válidos en humanos, es actualmente escasa. Los AF que han demostrado claramente poseer acciones funcionales son pocos: los probióticos (Roberfroid, 2000; Saavedra y col., 1994), alimentos ricos en ácidos grasos poliinsaturados tipo omega-3 (Kang y Leaf, 2000), alimentos de elevado contenido en fibra (Jenkins y col., 2000; Liu y col., 2000), por

citar algunos. Los efectos beneficiosos de otros AF, son, por el momento, especulativos. No obstante, el futuro es prometedor en cuanto a las propiedades como por ejemplo prebióticos, fitoesteroles, entre otros (Silveira-Rodríguez y col., 2003).

Japón es el único país que cuenta con una legislación específica para la comercialización y rotulado de este tipo de alimentos. En 1991, se estableció el concepto de "Alimentos para Uso Específico en la Salud" (Foods for Specified Health Use, FOSHU). Los alimentos que se incluyan dentro de la categoría de FOSHU deben ser autorizados por el Ministro de Salud, tras la presentación de pruebas exhaustivas con fundamento científico, que apoyen la alegación relativa a las propiedades de dichos alimentos, cuando son consumidos como parte de una dieta ordinaria. Una vez aprobado el alimento, se pueden indicar en la etiqueta del producto sus efectos beneficiosos para la salud, pero no de forma exagerada ni engañosa (Cóccaro, 2010).

En Europa, el *Functional Food Science in Europe* (FUFOSE) se propuso como objetivo alcanzar un consenso en cuanto al uso de AF basado en la evidencia científica. Se concluyó que los AF deben seguir siendo tales alimentos y que sus efectos beneficiosos deben alcanzarse con las cantidades que habitualmente se consumen en una dieta convencional. Se han propuestos dos tipos de alegaciones sanitarias: tipo A: promotores de una o más funciones; y tipo B: reducción del riesgo de enfermedades. En Europa solo se admiten alegaciones científicamente probadas y encaminadas a la prevención (Silveira-Rodríguez y col., 2003). La legislación europea relativa al etiquetado prohíbe atribuir a los alimentos propiedades preventivas, terapéuticas o curativas, y la referencia a dichas propiedades.

En los Estados Unidos se han diseñado *Health Claims* concernientes a la relación entre calcio y prevención/tratamiento de la osteoporosis, sodio e hipertensión arterial, grasa y cáncer, ácidos grasos y enfermedad cardiovascular, ácido fólico y defectos de cierre del tubo neural y consumo de frutas y verduras. Se encuentra en marcha el proyecto *PASSCLAIM* para efectuar un consenso para el sostenimiento científico de los AF, la identificación y validación de marcadores biológicos de los mismos, el diseño de estudios en seres humanos y la reevaluación de los esquemas actuales.

En Argentina, solo se permiten declaraciones nutricionales. Es decir, en el producto se debe indicar la presencia del compuesto bioactivo pero no se puede decir para qué sirve, cuáles son sus beneficios dado que de esa forma se estaría induciendo su consumo en forma tendenciosa (Cóccaro, 2010).

I.1.5. TENDENCIAS EN EL MERCADO LÁCTEO.

La demanda de productos asociados a “*Health & Wellness*” (salud y bienestar) ha crecido sostenidamente en los últimos años, y las nuevas tendencias alimentarias, se dirigen a una mejora del estado de salud y a la prevención de enfermedades.

En la actualidad, la mayoría de los alimentos probióticos del mercado son los yogures y algunas leches fermentadas, por lo cual el segmento lácteo se posiciona cómodamente para liderar con protagonismo casi excluyente en esta tendencia. De hecho, en la percepción de los consumidores, los lácteos son la categoría más asociada a los alimentos funcionales, y tienen tradicionalmente una imagen positiva; son símbolo de placer sano y natural (Schaller, 2008).

La estrategia es la diferenciación constante y el lanzamiento de nuevos productos a través de la incorporación de agregados, de la variación e innovación de los envases y de la adaptación a las nuevas demandas del consumidor. Asimismo, se realizan fuertes inversiones en investigación y desarrollo, servicios al cliente y publicidad (Schaller, 2008).

Las empresas tienden a cubrir las necesidades de segmentos de consumidores cada vez más específicos desarrollando productos para niños, jóvenes, deportistas, mujeres, adultos, celíacos, etc. En línea con la tendencia mundial, la elaboración de AF, enriquecidos con bacterias específicas, es hoy muy común en nuestro país. Como ejemplos se puede mencionar la introducción de los conceptos "Probio2", "Biopuritas", "Provitalis" o "Acti Regularis" por parte de Danone-La Serenísima; o el lanzamiento del concepto "Biototal", efectuado por Sancor. En este último caso se trata de una combinación de fermentos naturales seleccionados por la empresa, más calcio, vitaminas y minerales. También Sucesores de Alfredo Williner incorporó el cultivo probiótico BB-12 a su línea de yogures “Bioarmonis”, que mantiene el balance de la flora intestinal (Schaller, 2011). Además, se han desarrollado productos lácteos con fibra, con calcio, con AG omega-3, bajos en lactosa, con vitaminas, entre muchos otros.

I.2. LECHE FERMENTADAS.

Las leches fermentadas (LF) son productos de consistencia semisólida, en los que el fenómeno más importante es la transformación de la lactosa de la leche principalmente

en ácido láctico, y otros componentes, debido a la acción de microorganismos específicos que se inoculan en la leche. Además de la transformación de la lactosa, se producen fenómenos de proteólisis y lipólisis por acciones microbiana y enzimática, que confieren a los derivados determinadas características nutricionales y que también determinan su aroma, sabor y consistencia. Dentro de las LF acidificadas el ejemplo más claro es el yogur, elaborado a partir de los cultivos iniciadores: *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (Rodríguez Rivera y Magro, 2008).

La fermentación provoca también la coagulación de las proteínas, que también sufren un cierto grado de desdoblamiento. El aroma, cuya formación es muy compleja, se debe sobre todo a dos compuestos esenciales, el diacetilo y el acetaldehído (Spreer, 1991).

Muchas han sido las investigaciones desarrolladas para el aislamiento y cultivo de cepas seleccionadas, con el fin de mejorar la elaboración de las leches fermentadas. En consecuencia, se ha podido establecer cuál es la flora característica que diferencia cada uno de los tipos de leches fermentadas y controlar su producción y, asimismo, formular nuevos productos con intervención de cepas determinadas, que confieren características de composición propias a cada producto (Condon y Salcedo y col., 1998).

I.2.1. DEFINICIÓN.

El Código Alimentario Argentino, Ley 18.284, Capítulo VIII Alimentos lácteos, artículo 576 - (Resolución Conjunta SPyRS y SAGPyA N° 33/2006 y N° 563/2006) dispone que “*se entiende por Leches Fermentadas a los productos, adicionados o no de otras sustancias alimenticias, obtenidos por coagulación y disminución del pH de la leche o leche reconstituída, adicionada o no de otros productos lácteos, por fermentación láctica mediante la acción de cultivos de microorganismos específicos. Estos microorganismos específicos deben ser viables, activos y abundantes en el producto final durante su período de validez*” (Código Alimentario Argentino, 2010).

I.2.2. CLASIFICACIÓN.

Las LF se caracterizan por el cultivo específico utilizado para la fermentación, que por su actividad contribuye a la determinación de las características del producto terminado, tal como lo establece la Norma CODEX para leches fermentadas (CODEX STAN 243-2003) y el Código Alimentario Argentino (Código Alimentario Argentino,

2010), que incluye los productos lácteos obtenidos a partir de una tecnología equivalente a la de fabricación del yogur:

✓ *Yogur*: cultivos de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, a los que en forma complementaria pueden acompañar otras bacterias acidolácticas.

✓ *Leches Fermentadas o Cultivadas*: uno o varios de los siguientes cultivos: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium* sp., *Streptococcus thermophilus* y/u otras bacterias acidolácticas.

✓ *Leche Acidófila o Acidofilada*: exclusivamente con cultivos de *Lactobacillus acidophilus*.

✓ *Kefir*: cultivos ácidolácticos elaborados con granos de kefir, *Lactobacillus kefir*, especies de los géneros *Leuconostoc*, *Lactococcus* y *Acetobacter*, con producción de ácido láctico, etanol y dióxido de carbono. Los granos de kefir están constituidos por levaduras fermentadoras de la lactosa (*Kluyveromyces marxianus*) y levaduras no fermentadoras de la lactosa (*Saccharomyces omnisporus*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces exiguus*), *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium* sp. y *Streptococcus thermophilus*).

✓ *Kumys*: cultivos de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* y *Kluyveromyces marxianus*.

1.2.3. VALOR NUTRICIONAL.

Las LF son productos de gran valor nutricional. Su composición, similar a la de la leche de partida, difiere de ésta debido a la adición de distintos ingredientes y al proceso fermentativo (Early, 2000). El valor nutritivo de la fracción proteica (de alto valor biológico), así como la asimilación de la lactosa mejoran debido a la fermentación, que aumenta su digestibilidad, y la materia grasa, aunque muy influida por la leche de partida, también suele variar en función de las especies bacterianas fermentativas. El contenido vitamínico es difícil de establecer debido a la influencia que ejercen tanto los microorganismos (que sintetizan y asimilan distintas vitaminas) como a los tratamientos (térmico o desnatado) a los que se somete la leche. El calcio se destaca como mineral tanto por su riqueza (14 - 20 % de la cantidad diaria recomendada) como por su fácil absorción gracias al ácido láctico presente en estos alimentos (Montero Marín y col., 2006). Durante la incubación tiene lugar una cierta liberación de péptidos y

aminoácidos, lo que favorece la absorción intestinal del producto (Tamime y Robinson, 1991).

I.2.4. CONSUMO DE LECHE FERMENTADAS EN EL MERCADO ARGENTINO.

Según un informe efectuado por la Subsecretaría de Lechería del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación Argentina (2011), la producción de LF en el país ha aumentado un 300% entre 1990 y 2009 debido al explosivo crecimiento registrado en ese lapso en el consumo interno *per cápita*, el cual fue mayor al 200%, el máximo entre los lácteos. En la figura I.1. se muestra el aumento del consumo *per cápita* de LF en comparación con otros productos lácteos entre los años 1999 y 2009 en Argentina. En una nota publicada por el diario La Nación en febrero de 2012 (Manzoni, 2012), se llegó a un consumo anual de 15 kg de yogur por persona, cifra que lo convierte al país en el mayor consumidor de la región (Brasil o Chile sólo llegan a la mitad de esa cifra), siendo las perspectivas muy prometedoras, ya que auguran un crecimiento del 50% en 5 años, impulsado por una oferta más diversificada y la asociación cada vez más fuerte del producto con la vida saludable.

Debido a esto, el mercado de las LF es uno de los más dinámicos del sector lácteo. La estrategia es la diferenciación constante y el lanzamiento de nuevos productos a través de la incorporación de agregados, de la variación e innovación de los envases y de la adaptación a las nuevas demandas del consumidor. Se realizan fuertes inversiones en investigación y desarrollo, servicios al cliente y publicidad (Schaller, 2011). Las empresas tienden a cubrir las necesidades de segmentos de consumidores cada vez más específicos, para lo cual los productos se diferencian por su consistencia (firme, batida y bebible en leches fermentadas), por su contenido graso (entero, parcialmente descremado, descremado) y por su sabor (natural y saborizado).

A estas presentaciones hay que sumar una diversa gama de agregados: trozos o pulpa de fruta, cereales, crema, miel, organismos probióticos, fitoesteroles, sulfato ferroso, calcio y vitaminas, entre otros (Schaller, 2011).

La tendencia en el gusto local es la búsqueda de mayor sabor, por eso se ven yogures más cremosos, aunque con más calorías. Las empresas coinciden que los consumidores prefieren tienen la necesidad de darse un gusto y disfrutar de algo con valor nutricional pero que también sea delicioso, lo que llevó al cambio y reformulación

de algunos productos, como los yogures: Yogs cremoso (Sancor), Ser, Yogurísimo Cremix y Griego (estos tres último de la firma Danone).

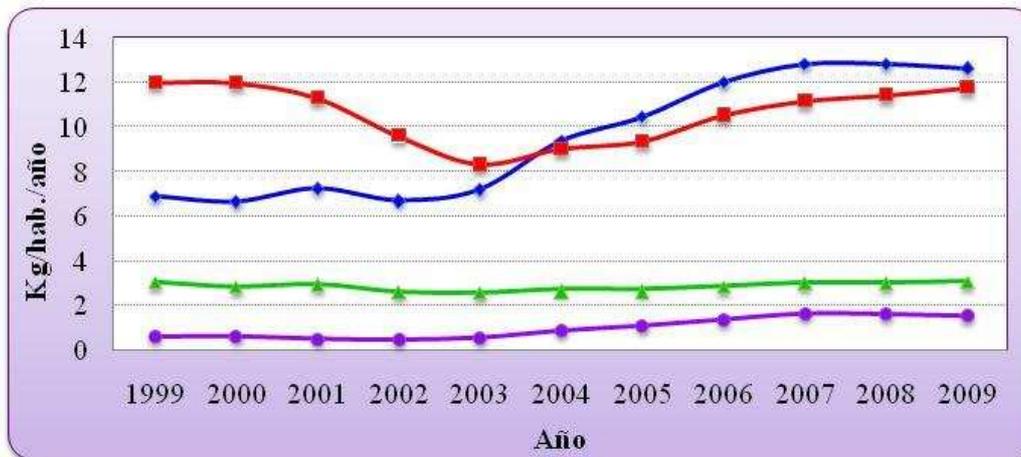


Figura I.1. Consumo de productos lácteos en Kg/habitante/año en Argentina entre 1999 y 2009. Azul: yogurt; rojo: queso; verde: dulce de leche; violeta: postres. (Fuente: Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación Argentina, 2010).

I.3. LECHE FERMENTADAS PROBIÓTICAS CON COLESTEROL REDUCIDO.

I.3.1. CONSTITUYENTES.

I.3.1.1. Leche.

El Código Alimentario Argentino (2010) dispone: Artículo 554 - (Res. 22, 30.01.95) "*Con la denominación de **Leche** sin calificativo alguno, se entiende el producto obtenido por el ordeño total e ininterrumpido, en condiciones de higiene, de la vaca lechera en buen estado de salud y alimentación, sin aditivos de ninguna especie*".

La leche es un líquido de composición compleja, blanco y opaco, de sabor dulce y pH próximo a la neutralidad (Alais, 2003).

I.3.1.1.1. Principales componentes de la leche.

La leche es un producto nutritivamente muy completo y su composición determina su calidad nutritiva, su valor como materia prima para fabricar productos alimenticios y muchas de sus propiedades (Early, 2000; Walstra y Jenness, 1987). Desde el punto de

vista fisicoquímico, la leche es considerada como una mezcla donde coexisten tres estados: emulsión, suspensión y solución. La emulsión está formada por la materia grasa bajo forma globular; las caseínas ligadas a sales minerales constituyen la fase de suspensión, mientras que los componentes disueltos en agua, tales como proteínas solubles, sales y lactosa, forman una solución verdadera conocida como lactosuero (Alais, 2003). En la tabla 1 se muestra la composición porcentual promedio de la leche entera de vaca.

La leche contiene agua, grasas de buena calidad como el ácido linoleico conjugado que favorece la función inmunitaria y disminuye el riesgo de padecer ciertas formas de cáncer; hidratos de carbono, donde se destaca la lactosa y proteínas de alto valor biológico, con gran contenido de aminoácidos esenciales. La leche y los productos lácteos son fuentes por excelencia del calcio dietario, mineral que ha sido relacionado con la prevención y tratamiento de la obesidad y osteoporosis. Se ha visto además el vínculo directo del consumo de lácteos en la prevención de otras patologías como hipertensión arterial, caries dentales, síndrome metabólico, enfermedades cardiovasculares, desarrollo de ciertos tipos de cánceres (colon y mama), diabetes mellitus tipo 2 y litiasis renal (Cornes, 2008).

En la tabla I.1. se muestra la composición porcentual promedio de los principales componentes de la leche entera de vaca.

Tabla I.1. Composición media en porcentaje (% m/m) de la leche entera de vaca (Fuente: Alais, 2003).

Agua	87,7
Extracto seco	12,3
Lactosa	4,75
Lípidos	3,40
Glicéridos	3,30
Fosfolípidos	0,05
Parte insaponificable (esteroles, carotenos, tocoferoles).	0,05
Proteínas	3,30
Caseínas	2,60
Proteínas solubles	0,55
Sustancias nitrogenadas no proteicas	0,15
Sales	0,85

I.3.1.1.1.1. *Agua.*

El agua es el componente principal de la leche, actuando esencialmente como disolvente de los demás componentes; el contenido total de agua influye principalmente sobre la textura y sobre las propiedades físicas y mecánicas de los alimentos (Spreer, 1991).

No obstante, en algunos derivados lácteos, como las leches fermentadas, el agua puede estar como *agua ligada químicamente*, por ejemplo en forma de agua de hidratación de las proteínas o los cristales de lactosa, y también como *agua libre*. Esta última determina la capacidad de conservación, es decir, la estabilidad microbiológica; propiedad expresada por la *actividad de agua* (a_w) (Spreer, 1991).

I.3.1.1.1.2. *Sustancias nitrogenadas.*

En la tabla I.2. se puede observar la composición en sustancias nitrogenadas de la leche de vaca. En torno al 95% del nitrógeno de la leche está en forma proteica, siendo las proteínas más abundantes las caseínas y dentro de éstas, las fracciones α_{s1} y β . Las cuatro caseínas (α_{s1} , α_{s2} , β y κ) poseen una estructura primaria diferente y bien conocida, mientras que las γ surgen de la hidrólisis de la β -caseína por acción de la plasmina. Las proteínas de suero, representan el grupo minoritario, donde la β -lactoglobulina y la α -lactoalbúmina son las que se destacan (Ordóñez Pereda, 1998).

Tabla I.2. Concentración media de sustancias nitrogenadas (% nitrógeno total) de la leche de vaca (Fuente: Ordóñez Pereda, 1998). *El subíndice S significa que esta fracción es sensible a los iones calcio (precipita en presencia de éstos).

PROTEÍNAS	95
<i>Caseínas</i>	76
α_{s1} *	30
α_{s2} *	8
β	27
κ	9
γ	2
<i>Proteínas del suero</i>	19
β -lactoglobulina	9,5
α -lactoalbúmina	3,5
Seroalbúmina bovina	1,0
Inmunoglobulinas	2,0
Otras	3,0
NITRÓGENO NO PROTEICO	5
Péptidos	
Aminoácidos libres	
Otras sustancias	

Las diferencias más importantes entre caseínas y proteínas del suero se presentan en la tabla I.3. (Ordóñez Pereda, 1998).

Tabla I.3. Diferencias más destacables entre caseínas y proteínas séricas (Fuente: Ordóñez Pereda, 1998).

	Caseínas	Proteínas del suero
Solubilidad a pH 4,6	No	Sí
Coagulación por quimosina (cuajo)	Sí	No
Termorresistencia	Sí	No
Fósforo	Sí	No
Azufre	0,8% (fundamentalmente Met)	1,7% (Met y Cis)
Origen	Glándula mamaria (Gm)	Gm y plasma
Estado	Coloidal (micelas)	En disolución

I.3.1.1.1.2.1. Caseínas.

Las caseínas son fosfoproteínas debido a que poseen grupos fosfatos fuertemente ligados y, además, establecen enlaces con calcio. Esto les proporciona, entre otras cosas, cierta estabilidad por lo que, no coagulan al ser cocidas. El intervalo isoeléctrico de la caseína va desde pH de 4,6 a 4,9. Por producirse la coagulación de la mayor parte de las fracciones de caseína a un valor de pH de 4,65, se considera este valor como punto isoeléctrico (Spreer, 1991).

En la leche, las caseínas se encuentran en forma de dispersión coloidal formando partículas de un tamaño variable, que reciben el nombre de micelas. Estas se conforman por caseínas y por componentes de baja masa molecular que reciben el nombre de fosfato cálcico coloidal. Al microscopio electrónico las micelas se observan como partículas esféricas con un diámetro entre unos 40 y 300 ηm (Ordóñez Pereda, 1998).

Debido a la importancia de las micelas de caseínas en el desarrollo de productos lácteos, su estructura ha sido estudiada extensamente, y continúa siendo debatida. Se han propuesto diferentes modelos para explicar la estructura de las micelas, siendo el más aceptado el modelo de las submicelas propuesto por Walstra (figura I.2.). Este modelo sugiere que las micelas están compuestas por subunidades esféricas de composición y tamaño variables, las submicelas, las cuales se mantienen unidas por interacciones hidrofóbicas entre las cadenas polipeptídicas y por puentes de fosfato de

calcio coloidal. Las regiones hidrofílicas y glicosiladas C-terminal de las caseínas κ (conocidas como caseinomacropéptido) se localizan en la superficie de las micelas, evitando la agregación de las mismas por impedimento estérico y repulsión electrostática (Phadungath, 2005).

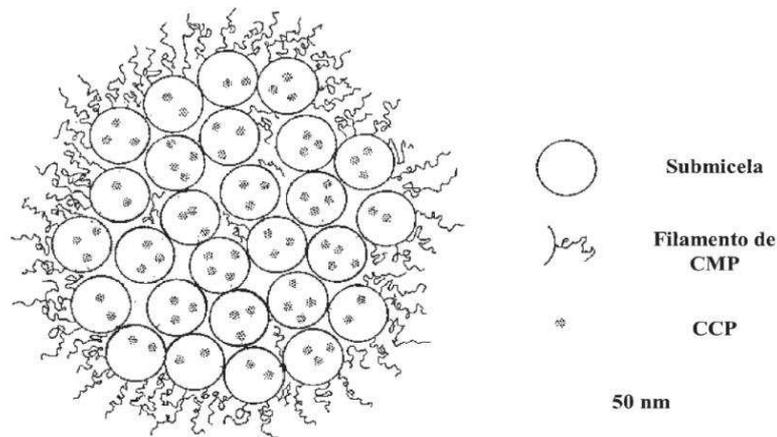


Figura I.2. Modelo de subunidades de la micela de caseína. CCP = fosfato de calcio coloidal, CMP = caseinomacropéptido (Fuente: Phadungath, 2005).

El modelo de unión dual propuesto por Horne es el más actual y el que mejor se adapta a las observaciones experimentales (figura I.3.). En este modelo, las micelas de caseína se forman por un balance entre interacciones hidrofóbicas atractivas entre las proteínas y repulsiones electrostáticas que limitan el grado de polimerización, limitando el crecimiento ininterrumpido de la misma. El fosfato de calcio coloidal neutraliza la carga negativa de residuos de fosfoserina de las α y β caseínas, reduciendo la repulsión electrostática entre ellas, por consiguiente la interacción hidrofóbica se vuelve dominante. Dado que las κ caseínas no son capaces de unir calcio debido a la escasa cantidad de grupos fosfato que poseen, interactúan sólo hidrofóbicamente con las demás proteínas, y exponen sus terminales hidrofílicas en la superficie de la micela, actuando como terminador (Phadungath, 2005). De esta forma, este modelo de estructura interna proporciona una explicación válida de los mecanismos de ensamblaje, formación y crecimiento micelar.

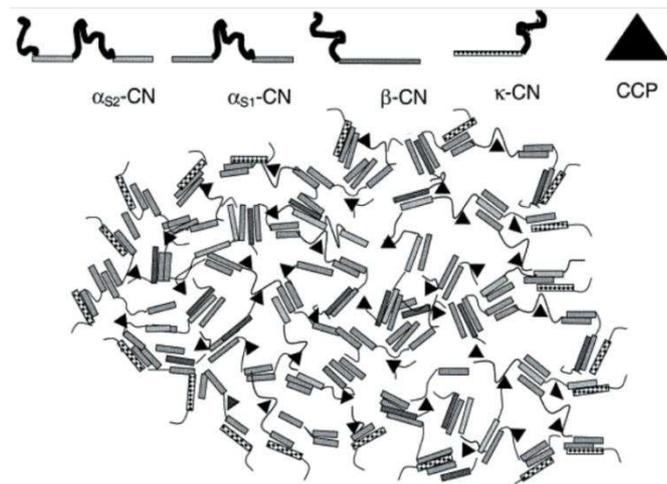


Figura I.3. Modelo de doble unión de la micela de caseína. CN = caseína, CCP = fosfato de calcio coloidal (Fuente: Phadungath, 2005).

I.3.1.1.1.2.2. *Proteínas del suero.*

Las proteínas del lactosuero son aquellas que permanecen en solución luego de la precipitación de las caseínas a pH 4,6 o menores; y constituyen aproximadamente el 20% de las proteínas de la leche. Son proteínas globulares, y a diferencia de las caseínas, no contienen fósforo (Spreer, 1991). Son sensibles a la temperatura, y se desnaturalizan y precipitan al calentar la leche (Phadungath, 2005).

Las principales proteínas del lactosuero de la leche de vaca son la α -lactoalbúmina y la β -lactoglobulina, ya que constituyen aproximadamente el 70% de las proteínas solubles. El resto son albúminas del suero sanguíneo, inmunoglobulinas, proteasas y muy bajas cantidades de otras proteínas con funciones específicas, tales como lisozimas y lactoferrinas (Phadungath, 2005; Spreer, 1991).

El gran valor nutritivo de estas proteínas deriva de una composición en aminoácidos muy favorable para la dieta, especialmente por el contenido elevado de cisteína, y de los aminoácidos esenciales lisina y triptófano; por esta causa contribuyen a corregir las deficiencias de las caseínas (Alais, 2003). Además, poseen un valor biológico (VB) muy elevado (VB = 125), mayor que el de las caseínas (VB = 88) y las proteínas del huevo (VB = 100), lo cual es un indicio de la alta calidad nutricional de las mismas (Spreer, 1991).

La más interesante desde un punto de vista tecnológico es la β -lactoglobulina, que a temperaturas superiores a 74 °C se desnaturaliza, forma grumos y libera grupos sulfhidrilo, que son los responsables del sabor a cocido que a veces presenta la leche.

Asimismo, esta desnaturalización favorece la unión de la β -lactoglobulina con la κ -caseína lo cual es deseable en la elaboración de leches fermentadas ya que contribuye a una mejor calidad de las mismas, reduciendo la sinéresis (separación del suero) y aumentando la viscosidad (Spreer, 1991).

I.3.1.1.1.3. *Hidratos de carbono.*

La lactosa, el carbohidrato característico de la leche, es un disacárido compuesto por los monosacáridos glucosa y galactosa. La lactosa juega un importante papel tecnológico en todos los procesos de acidificación de la leche ya que representa el sustrato nutritivo para las bacterias lácticas y también tiene interés tecnológico su propia obtención (Spreer, 1991).

I.3.1.1.1.4. *Lípidos.*

I.3.1.1.1.4.1. *Composición.*

De todos los componentes de la leche, la fracción lipídica es la que mayor variación presenta, siendo la concentración promedio de 3,4% m/m y oscilando en un rango de 2,4 a 5,5 %. Entre los factores que más influyen en la composición lipídica se encuentran la raza, la alimentación, etapa de lactación, salud. Otros son: época del año, zona geográfica y prácticas ganaderas (Tamime, 2009; Walstra y Jenness, 1987).

Como puede observarse en la tabla I.4., los triglicéridos son los componentes mayoritarios, constituyendo más del 98% del total los lípidos. En menor proporción se hallan otros glicéridos, fosfolípidos, colesterol libre y sus ésteres, ácidos grasos libres y ciertos glicolípidos (Walstra y Jenness, 1987).

Además, en la leche existen otros componentes lipídicos minoritarios, presentes en cantidades traza. Entre ellos pueden mencionarse los carotenoides, vitaminas liposolubles (vitaminas A, E, D y K), esteroides, tocoferoles y compuestos del *flavor* que contribuyen a las propiedades organolépticas de la leche (MacGibbon y Taylor, 2006; Tamime, 2009).

En lo que se refiere a la composición de ácidos grasos, se han identificado en la leche más de 400, de los cuales sólo 15 están presentes en concentraciones mayores al 1%, respecto a grasa. Entre el 65–70% son ácidos grasos saturados, el 25% son monoinsaturados y el 4% son poliinsaturados (MacGibbon y Taylor, 2006).

Tabla I.4. Composición media porcentual (% m/m) de lípidos de la leche entera (Fuente: Walstra y Jenness, 1987).

Glicéridos	Triglicéridos	98,3
	Diglicéridos	0,30
	Monoglicéridos	0,03
Ácidos grasos libres		0,10
Fosfolípidos		0,80
Esteroles	Colesterol	0,30
	Ésteres de colesterol	≈ 0,02
Glicolípidos	Cerebrósidos	0,10
	Gangliósidos	0,01

Dentro de los saturados, se encuentran moléculas de tamaños que varían entre 4 a 18 átomos de carbono; siendo los mayoritarios los ácidos palmítico (C16:0) (24–31%), esteárico (C18:0) (10–15%) y mirístico (C14:0) (9–12%). Los ácidos grasos de cadena corta (C4:0 y C6:0) y mediana (C8:0 a C12:0), que representan aproximadamente un 15% del total, poseen características particulares, ya que son absorbidos al torrente sanguíneo y metabolizados rápidamente, actuando como una fuente de energía rápida (McGibbon y Taylor, 2006).

El ácido oleico (C18:1) es el más abundante de los monoinsaturados (15–22%); mientras que los ácidos linoleico y linolénico, ambos poliinsaturados y esenciales para la nutrición humana, representan un 2–3% (McGibbon y Taylor, 2006).

Dentro de los ácidos grasos poliinsaturados, la leche contiene aproximadamente un 1,75% de ácido linoleico conjugado (CLA). CLA es un término colectivo que se utiliza para describir los isómeros posicionales y geométricos del ácido linoleico (C18:2), donde los dobles enlaces están presentes en las posiciones 9 y 11 o 10 y 12, pudiendo tener cada uno configuración *cis* o *trans* (McGibbon y Taylor, 2006; O'Quinn y col., 2000).

El colesterol es el precursor de todos los demás esteroides del organismo, tales como los corticosteroides, las hormonas sexuales, los ácidos biliares y la vitamina D. Un poco más de la mitad del colesterol del organismo se origina de su síntesis (cerca de 700 mg/día) y el resto es proporcionado por una alimentación promedio (Mayes, 1997).

La grasa de la leche contiene alrededor de un 0,3% de colesterol, unos 12-13 mg cada 100 gramos de leche, siendo éste el componente más importante de la parte insaponificable (Alais, 2003).

I.3.1.1.1.4.2. *Estructura del glóbulo graso.*

La materia grasa se encuentra dispersa en la leche bajo la forma de glóbulos esféricos, distribuidos en un rango de diámetro variable entre 0,2 y 15 μm . Los glóbulos grasos (GG) están constituidos por un núcleo compuesto principalmente por triglicéridos (McGibbon y Taylor, 2006), envuelto por una cubierta compleja de naturaleza lipoprotéica, llamada membrana del glóbulo graso (Alais, 2003; Huppertz y Kelly, 2006) (figura I.4.). El núcleo está compuesto por triglicéridos de bajo punto de fusión (en la parte interna) rodeados de triglicéridos de alto punto de fusión (parte externa). La membrana del glóbulo graso contribuye a estabilizar la emulsión, ya que mantiene los lípidos en forma de gotas dispersas, evitando la coalescencia y protegiéndolos de la lipólisis (Spitsberg, 2005; Vanderghem y col., 2008). Está formada por varias capas, pudiéndose diferenciar hasta tres: la *capa interna*, semejante a una membrana celular, constituida por proteínas globulares y por fosfolípidos, fundamentalmente fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina. Se encuentra firmemente unida a la parte externa del núcleo del GG. La *capa intermedia* en la que se encuentra agua ligada y metales como cobre, hierro y zinc que se fijan fácilmente a la membrana. La *capa externa* donde se localizan las actividades enzimáticas, está compuesta por lipoproteínas más ricas en fosfolípidos y proteínas que la capa interna (Ordóñez Pereda, 1998).

Por su parte, el colesterol se encuentra formando parte del GG, ya que tiene baja solubilidad en agua, encontrándose tanto en la membrana (10 %) como en su interior (80 %), y el 10 % restante en el plasma exterior a dicho glóbulo, estando un 90 % en forma libre y 10 % esterificado (Spreer, 1991).

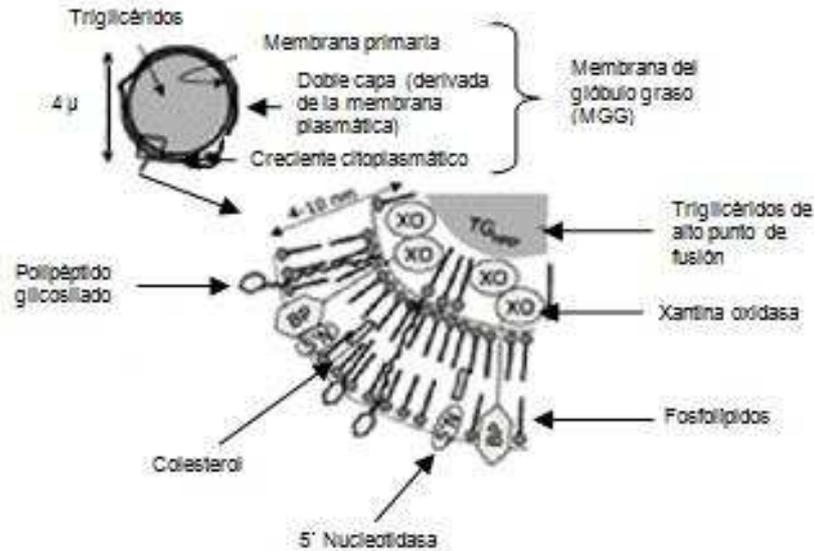


Figura I.4. Representación esquemática del glóbulo graso en leche.
(Fuente: www.drcate.com/raw-milk-why-mess-with-udder-perfection).

I.3.1.1.4.3. Lípidos y su asociación con enfermedades cardiovasculares.

Los lípidos (fosfolípidos, triglicéridos y colesterol), al no ser solubles en un medio acuoso como el plasma, se unen a proteínas específicas (apoproteínas) para formar las lipoproteínas y poder así circular en sangre. Existen cinco clases principales de lipoproteínas séricas. En orden creciente de densidad tenemos: quilomicrones; lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL); lipoproteínas de densidad intermedia (IDL); lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL). A medida que se incrementa la densidad de estas partículas, el porcentaje de triglicéridos decrece, mientras que el de proteínas aumenta (Parodi, 2009).

En el hombre, un 60 – 70 % del colesterol es vehiculizado por las lipoproteínas de baja densidad (LDL), el 20 – 30 % por las de alta densidad (HDL) y el 5 - 10 % restante por las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) (Taranto y col., 2005).

Por otro lado, en Argentina, sobre un total de 304.525 muertes ocurridas en 2009, 89.916 fueron por causas cardiovasculares, 57.590 por cáncer, 7.701 por diabetes y 4.711 por enfermedades crónicas respiratorias, siendo los problemas cardiovasculares la primera causa de muerte (aproximadamente 30%) en nuestro país (Ferrante, 2011).

La aterosclerosis coronaria, enfermedad caracterizada por el engrosamiento focal de la porción interna de la pared de las arterias coronarias, es la principal causa de enfermedad isquémica del corazón (Castillo y col., 2005).

El colesterol elevado es un componente clave en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. Explica el 18% de la enfermedad cerebrovascular y 59% de la enfermedad coronaria, explicando el 7,9% de todas las muertes (Ministerio de Salud de la Nación, 2006). Actualmente, el 30% de la población que se realiza controles de salud, posee colesterol elevado, siendo también importante la cantidad de personas que no se realizan ningún tipo de control y desconoce cómo se encuentra su salud (Ferrante, 2011).

En numerosos estudios epidemiológicos se encontró una asociación positiva entre los niveles de colesterol sérico y el riesgo de padecer enfermedad cardiovascular (ECV). Altos niveles de LDL-colesterol (“colesterol malo”) se asocian positivamente con el riesgo de desarrollar ECV, mientras que niveles elevados de HDL-colesterol (“colesterol bueno”) están asociados negativamente con ECV (Parodi, 2009).

Otros factores de riesgo importantes son la obesidad, la inactividad física, hipertensión, diabetes, problemas psicosociales y niveles elevados de homocisteína sérica. Muchos de estos se encuentran asociados entre sí, sinergizando sus efectos (Parodi, 2009).

Además, el colesterol se oxida produciendo compuestos perjudiciales para la salud, ya que poseen comportamiento aterogénicos (Peng y col., 1991a), citotóxicos (Peng y col., 1991b), mutagénico y carcinogénico (Morin y col., 1991).

Por otra parte, no todos los AGS poseen idéntica potencia hipercolesterolemica. Los de cadena corta (C4:0, C6:0, C8:0, C10:0), presentes en la grasa láctea, después de la absorción entran a la circulación portal y pasan al hígado donde son rápidamente oxidados. Ellos no tienen efecto en el incremento del colesterol (Parodi, 2009).

Si bien los AGS C12:0, C14:0, C16:0 y C18:0 incrementan los niveles séricos de colesterol total y de LDL-colesterol, también aumentan los niveles de HDL - colesterol antiaterogénico (Parodi, 2009).

Un predictor más poderoso del riesgo de ECV, que los niveles de LDL - colesterol o de colesterol total, es la relación *colesterol total / HDL – colesterol*, también conocido como Índice de Castelli (IC) (Parodi, 2009; Siniawski y col. 2011). Cuánto menor es el valor de este cociente, menor es el riesgo de padecer ECV (Parodi, 2009).

El consumo de AGS (C12:0, C14:0, C16:0 y C18:0, presentes en leche y productos lácteos enteros), en comparación con una dieta elevada en carbohidratos, baja en grasa y en AGS, tiene un efecto benéfico sobre la reducción de los niveles de apolipoproteína A aterogénica y de las partículas LDL más pequeñas y densas (asociadas al desarrollo del

infarto del miocardio). En general, el efecto de estos AGS sobre las lipoproteínas séricas sugiere que pueden ser aterogénicamente neutros (Parodi, 2009).

I.3.1.1.1.4.4. *Revalorización de la grasa láctea.*

Los lípidos figuran entre uno de los constituyentes más importantes de la leche. Sin embargo, la grasa láctea no ha sido muy apreciada, anteriormente, debido a la presencia de ácidos grasos saturados (AGS) y colesterol. Tal como se discutió anteriormente (apartado I.3.1.1.1.4.3.), evidencias recientes muestran que, en general, los AGS C12:0, C14:0, C16:0 y C18:0 podrían ser aterogénicamente neutros e incluso tener una influencia negativa sobre la aterogénesis y, por lo tanto, un 60 % de los ácidos grasos presentes en la leche no tendrían efecto negativo sobre la salud. El porcentaje restante son AG insaturados (C18:1 y C18:2) benéficos para la salud (Parodi, 2009; Recio y López-Fandiño, 2005).

Además contiene concentraciones substanciales de AGS de cadena corta y media (menor a 12 átomos de carbono) que son empleados como fuente de energía rápida, por lo que tienen baja tendencia de acumularse en el tejido adiposo (Parodi, 2009; Recio y López-Fandiño, 2005).

Asimismo, la grasa láctea es el vehículo de vitaminas liposolubles (principalmente D, antirraquítica) y carotenoides, favoreciendo la biodisponibilidad de estos compuestos (Gayoso, 2009; Recio y López-Fandiño, 2005).

Cada vez hay más evidencia científica del efecto beneficioso para la salud de determinados componentes de la grasa de la leche, como el ácido butírico, los lípidos polares y el ácido linoleico conjugado (CLA) (Gayoso, 2009; Recio y López-Fandiño, 2005).

El ácido butírico de la grasa láctea ha sido especialmente estudiado en los últimos años por su posible actividad anticancerígena demostrada en cultivos celulares. En ciertos tipos de cáncer, como el cáncer de mama, el cáncer de colon, se está estudiando su potencial actividad en la prevención de los mismos (Recio y López-Fandiño, 2005).

Los fosfolípidos y esfingolípidos, presentes principalmente en la membrana del glóbulo graso, han suscitado un gran interés por sus múltiples beneficios para la salud. La prevención del cáncer de colon, la disminución de los niveles de colesterol, su efecto bactericida y la mejora de la función cerebral son algunas de las propiedades atribuidas a esta fracción lipídica de la leche (Gayoso, 2009).

El CLA ha demostrado ejercer distintos efectos anticancerígenos. De los estudios llevados a cabo en humanos, se puede concluir que CLA sería beneficioso en la prevención de algunas enfermedades por su acción sobre el metabolismo lipídico y la respuesta inmune. Así, todos estos compuestos podrían inhibir o retrasar el avance de enfermedades tales como el cáncer, la aterosclerosis y la diabetes (Recio y López-Fandiño, 2005).

Por otra parte, las leches descremadas carecen de vitaminas liposolubles y ácidos grasos esenciales, poseen un valor calórico disminuido con respecto a la leche entera y tienen propiedades organolépticas y texturales desmejoradas (Contarini y col., 2002; Park, 1999; Park, 2000), debido a que el contenido de grasa de los alimentos posee una gran influencia sobre sus características sensoriales y su aceptabilidad. La reducción del contenido en grasa de los alimentos no solo da lugar a cambios importantes en la textura, sino también en las características relacionadas con el olor y el *flavor* (Carrapiso y col., 2004).

I.3.1.1.1.5. *Sales.*

Las sales de la leche, cationes metálicos y aniones orgánicos e inorgánicos, pueden aparecer en concentraciones elevadas (macroelementos) o en bajas concentraciones (elementos traza) (Spreer, 1991).

La leche y sus derivados contienen calcio de buena calidad, que es mejor absorbido por los huesos gracias a la lactosa y a las proteínas de los lácteos. Este mineral es uno de los principales responsables de la mineralización ósea, la cual comienza a producirse en la niñez. Pero además de calcio, los productos lácteos contienen magnesio, vitamina D y una excelente relación calcio/fósforo, necesaria para el desarrollo y fortalecimiento del esqueleto (Cornes, 2008).

En las LF, particularmente, durante la coagulación ácida bacteriana existe una migración progresiva del calcio coloidal hacia la solución, por lo tanto el coágulo que se forma está desmineralizado (Alais, 2003).

I.3.1.1.2. *Leche en polvo entera.*

La leche en polvo entera (LPE), o leche en polvo con toda su grasa, se obtiene a partir de leche entera fluida que se estandariza para que el producto final contenga un porcentaje graso del 25-28% (Early, 2000) y se concentra en evaporadores de película descendente, obteniéndose en polvo por el método de secado *spray* (Spreer, 1991). El

agua de la leche fluida es eliminada mediante un proceso de secado, mediante el cual se obtiene un producto sólido que mantiene la composición y calidad de la materia prima de partida. El secado aumenta el período de conservación de la leche, reduciendo simultáneamente su peso y volumen, lo que hace que se reduzca el costo de su transporte y facilita su almacenamiento (Gösta Bylund, 2003).

La utilización de LPE para la elaboración de leches fermentadas resulta ventajosa debido a que permite asegurar una composición y calidad constante y a que facilita su almacenamiento y durabilidad.

I.3.1.1.3. Leche en polvo descremada.

Se pueden distinguir dos tipos de leche en polvo descremada (LPD) que varían en su producción y por tanto en su composición. En el primero se aplica un secado suave lo que otorga una buena solubilidad mientras que en el segundo tipo de LPD se lo somete a un intenso tratamiento térmico en un secador de rodillos. En este último caso, dependiendo de la intensidad del calentamiento se logra diferentes grados de desnaturalización de las proteínas del suero (Gösta Bylund, 1993).

Un problema común en la elaboración de las leches fermentadas es la baja firmeza y la elevada sinéresis debido a la baja cantidad de sólidos totales. El agregado de ingredientes a base de caseína como la leche en polvo descremada mostró ser una solución ya que aumentan la firmeza y reducen la sinéresis (Amatayakul, 2006).

I.3.1.2. Cultivo iniciador-acidificante.

I.3.1.2.1. Bacterias ácido lácticas.

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un conjunto de bacterias Gram - positivas, no esporuladas, en forma de cocos o bastones con un metabolismo estrictamente fermentativo produciendo ácido láctico como el mayor producto final de la fermentación de los azúcares vía Embden - Meyer - glucólisis (homofermentación). En otras ocasiones producen además etanol, acetato y CO₂ por la vía del ácido-6-fosfogluconico (heterofermentación). Poseen complejas necesidades de factores de crecimiento: vitamina B, aminoácidos, péptidos, bases púricas y pirimídicas. Esta es una de las razones del por qué desarrollan en un medio tan rico nutricionalmente como la leche. Otra característica de este grupo de bacterias es su tolerancia al pH ácido (pH = 5, incluso a veces menores), pero conforme el medio se va acidificando, resultan inhibidas un mayor número de especies (Cabeza Herrera, 2006). Las BAL obtienen compuestos

nitrogenados a partir del ataque enzimático de la caseína. Aunque son moderadamente proteolíticas, su actividad resulta suficiente y fundamental para posibilitar su desarrollo en un medio como la leche (rol biológico), contribuyendo a la textura y, en menor medida, al sabor del producto final (rol tecnológico) (Guglielmotti, 2003).

I.3.1.2.1.1. *Principales grupos.*

Las BAL, comprenden varios géneros que se caracterizan por fermentar los hidratos de carbono produciendo ácido láctico. Las BAL están constituidas por *Lactococcus*, *Vagococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Weissella* y *Carnobacterium* y son microorganismos “seguros” o GRAS (en inglés: *generally recognized as safe*), lo que las hace ideales para la producción de alimentos (Leveau y Bouix, 2000).

I.3.1.2.2. *Rol de las bacterias acidolácticas en la elaboración de leches fermentadas.*

La principal aplicación de las BAL como cultivos iniciadores en la industria láctea ha sido para la obtención de yogur y diversos quesos madurados (Cabeza, 2006).

Un cultivo iniciador puede estar formado por uno o más microorganismos y generalmente por varias cepas de la misma especie (Ordóñez Pereda, 1998). En el caso del yogur, durante la preparación del mismo, se emplea una mezcla de cepas de *S. thermophilus* y *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*. Ambas subespecies son anaerobias facultativas, termófilas (temperatura óptima de crecimiento entre 40 y 45 °C) y homofermentativas (el ácido láctico formado representa del 90 al 97 % de la lactosa fermentada) (Alais, 1985; Gösta Bylund, 1995).

S. thermophilus y *L. bulgaricus* presentan una relación protosimbiótica cooperativa durante el proceso de elaboración de LF, ya que el lactobacilo estimula primero el crecimiento del estreptococo al generar valina, histidina y glicina y éste, en su desarrollo, genera ácido fórmico (y dióxido de carbono y ácido pirúvico), que estimula el crecimiento del *Lactobacillus* (Lourens-Hattingh y Viljoen, 2001).

Las BAL tienen como objetivo, en la producción de LF la acidificación, la mejora de la textura y el desarrollo del *flavor* (modificando las condiciones del medio para que ocurran las reacciones, mediante la producción de metabolitos y/o hidrolizando las proteínas de la leche, liberando péptidos, aminoácidos y compuestos volátiles). Como se dijo anteriormente, al fermentar la lactosa acidifican el medio hasta valores que inhiben

el crecimiento de microorganismos patógenos. Por otra parte, la textura de la LF depende del ácido láctico ya que la coagulación se debe a un progresivo descenso del pH; asimismo el empleo de BAL productoras de exopolisacáridos pueden mejorar aún más la textura y viscosidad del producto (Early, 2000).

I.3.1.3. Microorganismo probiótico.

De la definición aportada en el apartado I.1.3.5. se desprenden tres importantes puntos para poder considerar un microorganismo como probiótico (Ashwell, 2004):

- ✓ Estar presentes como células vivas y, preferentemente, en altas concentraciones.
- ✓ Encontrarse estables y viables durante todo el período de vigencia del producto.
- ✓ Poder proveer beneficios para la salud del anfitrión.

Los cultivos más frecuentemente utilizados como probióticos para humanos incluyen especies de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Vinderola y col., 2011).

I.3.1.3.1. Consideraciones para la utilización de probióticos en productos lácteos.

Hoy en día, los yogures y otras LF constituyen los principales vehículos para el aporte de probióticos, ya que, además de las propiedades funcionales de las bacterias inoculadas, estos alimentos tienen gran aceptación en los distintos grupos de población y son fáciles de digerir (Sanz y col., 2003).

Un aspecto importante en la producción de LF probióticas es la interacción entre los probióticos y los microorganismos iniciadores (Heller, 2001). Se pueden producir diferentes interacciones entre las distintas cepas, que estimulen, inhiban o no produzcan efectos en la velocidad de crecimiento bacteriano y actividad metabólica. En general, las bacterias probióticas demuestran ser más inhibitorias hacia las bacterias acidolácticas iniciadoras que viceversa (Vinderola y col., 2002).

La mayor parte de los productos que contienen probióticos se estandarizan en función del contenido de células viables, debido a que a que existe una importante disminución de los mismos durante el tránsito en el aparato digestivo, no sobreviviendo a la acción de ácidos estomacales y ciertas enzimas (Recio y López - Fandiño, 2005). En general, la industria alimentaria y diversos investigadores apuntan a mantener la presencia de 10^6 UFC.g⁻¹ o más en el alimento donde fueron adicionadas, en el momento de consumo (Dave y Shah, 1996; Kristo y col., 2003; Sanz y col., 2003).

La decisión debería basarse en legislaciones o recomendaciones de organismos internacionales con una alta credibilidad. Por su parte, la Federación Internacional de Lechería (IDF-FIL) recomienda que productos lácteos tales como la leche acidófila, contengan al menos 10^7 UFC.mL⁻¹ o g de cultivo probiótico (IDF-FIL, 1992).

1.3.1.3.2. *Lactobacillus rhamnosus* como probiótico.

L. rhamnosus ha sido estudiado extensamente y se ha encontrado que posee un gran número de propiedades que constituyen las bases para implementar su uso en salud y en investigación clínica (Calderón y col., 2007). Es un microorganismo apto para la utilización como probiótico, ya que cumple con los criterios funcionales, tecnológicos, biológicos y de bioseguridad, necesarios para tal fin (Lacroix y Yildirim, 2007; Mercanti, 2007; Stanton y col., 2003; Vinderola y col., 2011).

Se trata de una especie que habita naturalmente en el tracto gastrointestinal humano, segura e inofensiva para el huésped, ya que posee el carácter GRAS, por lo tanto es probadamente no patógena, sin efectos mutagénicos ni carcinogénicos, respondiendo de este modo al criterio de bioseguridad (Mercanti, 2007; Sanz y col., 2003).

Con respecto a las propiedades biológicas, las bacterias utilizadas como probióticos deben retener una viabilidad significativa durante el pasaje a través del tracto gastrointestinal (Mercanti, 2007; Vinderola y col., 2011). Se ha comprobado que *L. rhamnosus* es tolerante al pH bajo y a los fluidos pancreáticos y biliares, y además posee una buena adhesión a las glicoproteínas del íleon humano y a la mucosa del colon, características importantes para aumentar la supervivencia y favorecer la colonización temporal en el intestino (Alander y col., 1999; Calderón y col., 2007).

El criterio funcional se refiere a la acción benéfica de la cepa bacteriana en el huésped, y debe ser determinada fehacientemente en estudios clínicos adecuados (Mercanti, 2007; Vinderola y col., 2011). Diversos estudios han demostrado actividad antimicrobiana de *L. rhamnosus* contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Clostridium perfringens* (Calderón y col., 2007). La administración de ciertas cepas de *L. rhamnosus* en niños mostró un efecto de prevención de diarrea aguda y disminución de diarrea causada por Rotavirus y *Clostridium difficile* (Alander y col., 1999; Sanz y col., 2003; Shida y Nanno, 2008). Además, pudo demostrarse una reducción de la incidencia de infecciones respiratorias, mejoramiento de la inmunidad intestinal y una disminución de síntomas de dermatitis atópica en personas con alergias alimentarias (Alander y col., 1999; Shida y Nanno, 2008). Otros estudios mostraron que

la administración del probiótico redujo la incidencia del número de tumores en animales inducidos artificialmente con cáncer de colon (Koop, 2001).

Desde el punto de vista tecnológico, se pudo determinar que *L. rhamnosus* no posee actividad antimicrobiana contra bacterias ácido lácticas, es aerotolerante, posee excelente viabilidad en yogur durante cuatro semanas de almacenamiento a 4 °C, y es útil en su producción ya que es capaz de crecer durante la fermentación y además proporciona buenas características organolépticas (Calderón y col., 2007).

I.3.1.4. Concentrado de proteínas del suero.

El concentrado de proteínas del suero (WPC, del inglés *Whey Protein Concentrate*) es un producto derivado del lactosuero, la sustancia líquida obtenida por separación del coágulo de leche durante la producción de quesos (Parra, 2009). Las proteínas del suero son concentradas por la remoción de agua, lactosa y minerales mediante diversos métodos de separación, entre ellos precipitación, centrifugación, ultrafiltración o utilización de membranas semipermeables (Spreer, 1991). Se lo clasifica según el contenido de proteínas (% de proteínas en la materia seca), el cual puede variar entre un 35 y un 85% dependiendo del grado de ultrafiltración que se le realice.

El WPC se utiliza ampliamente en la industria alimentaria debido a las propiedades nutricionales y funcionales de las proteínas que contiene. El objetivo principal de su adición al yogur es aumentar el porcentaje de sólidos lácteos no grasos para conseguir las propiedades reológicas deseadas, dando como resultado un producto con textura, consistencia y apariencia mejoradas (Huginin, 2008; Ordóñez Pereda, 1998). Además, existen otros beneficios resultantes de su adición:

✓ Sabor mejorado: en comparación con las caseínas, las proteínas del lactosuero tienen menor tendencia a enmascarar los sabores ya que son insípidas (Huginin, 2008). Los análisis sensoriales de LF adicionadas con WPC al 3% generalmente muestran mayores puntuaciones en sabor, aroma y aceptación global (Requena y col., 2005).

✓ Enriquecimiento nutricional: se trata de una fuente concentrada de nutrientes de leche, principalmente proteínas de elevado valor biológico y alto contenido de aminoácidos esenciales (Huginin, 2008; Parra, 2009).

✓ Sinéresis reducida: uno de los beneficios más significativos del WPC es su efecto sobre la sinéresis durante el almacenamiento del yogur. Esto se debe a que la β -lactoglobulina y la α -lactoalbúmina forman redes tridimensionales capaces de hincharse

en agua y retener una fracción significativa de agua dentro de esta estructura (Amatayakul, 2006; Hugunin, 2008; Parra, 2009).

✓ Efectos funcionales: se ha demostrado en animales una acción anticarcinogénica, hipocolesterolémica, hipotensiva, y un aumento de la respuesta inmune tanto celular como humoral (Baro y col., 2001; Kawase y col., 2000).

I.3.1.5. Endulzantes.

I.3.1.5.1. Sacarosa.

El objetivo de adicionar edulcorantes a las leches fermentadas es el de reducir el sabor ácido del producto y aumentar la aceptabilidad sensorial, elevando el sabor dulce. La sacarosa y la glucosa son los edulcorantes más utilizados en la industria alimenticia (Early, 2000). Asimismo, el agregado de sacarosa tendría un efecto inhibitorio en el desarrollo de levaduras y mohos osmofílicos, aunque se debe tener cuidado con las concentraciones de azúcar utilizadas ya que modifican la presión osmótica y reducen la actividad acuosa pudiendo inhibir también a los microorganismo fermentadores (Early, 2000), es por ello que se agregan en cantidades no mayores al 10% para no afectar negativamente a las bacterias lácticas (Spreer, 1991).

I.3.1.6. Aditivos.

I.3.1.6.1. Definición.

Según el Código Alimentario Argentino (Capítulo I, artículo 6) un **aditivo** es: *cualquier sustancia o mezcla de substancias que directa o indirectamente modifiquen las características físicas, químicas o biológicas de un alimento, a los efectos de su mejoramiento, preservación, o estabilización, siempre que:*

a) Sean inocuos por sí mismos o a través de su acción como aditivos en las condiciones de uso.

b) Su empleo se justifique por razones tecnológicas, sanitarias, nutricionales o psicosensoriales necesarias.

c) Respondan a las exigencias de designación y de pureza que establezca este Código.” (Código Alimentario Argentino, 2010).

I.3.1.6.2. *Hidrocoloides.*

I.3.1.6.2.1. *Generalidades.*

Los hidrocoloides son los aditivos más ampliamente utilizados en la industria láctea. Son sustancias macromoleculares de carácter hidrófilo que son solubles, hinchables y dispersables en agua y en soluciones acuosas; y que producen disoluciones coloidales altamente viscosas, suspensiones o geles. Son de origen animal o vegetal, y algunos se obtienen también por síntesis microbiana (Spreer, 1991).

Entre los hidrocoloides se incluyen sustancias con distinta funcionalidad en los alimentos (Spreer, 1991):

- ✓ Aglomerantes: agentes empleados para aglutinar, ligar o unir sustancias.
- ✓ Espesantes: hidrocoloides hidrófilos que producen sustancias altamente viscosas, suspensiones, disoluciones coloidales o geles.
- ✓ Estabilizantes: sustancias que forman películas tensioactivas o cargas eléctricas dando alimentos con estados coloidales estables.
- ✓ Emulgentes: son sustancias anfipáticas que reducen las fuerzas de tensión superficial entre las distintas fases, transformándolas en sistemas finamente dispersos.

La elevada capacidad de unir agua de los hidrocoloides proporciona un efecto gelificante y espesante en productos lácteos como el yogur, manteniendo la estabilidad del producto durante la manufactura y el almacenamiento (Lal y col., 2006).

El objetivo principal de la adición de hidrocoloides a las LF es el de aumentar las características deseables de las mismas, como la viscosidad y consistencia, cuerpo, textura, apariencia y sensación de suavidad en la boca (*mouthfeel*), además de impartir buena resistencia a la sinéresis (Lal y col., 2006; Supavitpatana y col., 2007). Por otro lado, también se utilizan para minimizar los daños en el coágulo del yogur, que pueden producirse por la acción mecánica durante la elaboración (Tamime y Robinson, 1991).

Algunos de los aditivos más utilizados en yogur para estos fines son gomas naturales y modificadas, galactomananos, extractos de algas (carragenatos, alginatos), almidones y gelatina (Lal y col., 2006; Tamime y Robinson, 1991), los cuales actúan formando redes que retienen el agua reduciendo el flujo de ésta en el interior de la matriz (Supavitpatana y col., 2007).

Los hidrocoloides son empleados en la manufactura de LF como compuestos individuales o combinados. La finalidad de utilizarlos en combinación es lograr una función específica o, en la mayoría de los casos, superar una propiedad limitada asociada a uno de los compuestos para mejorar las características reológicas del

producto. En ocasiones, al utilizar una mezcla de estos aditivos se logra una disminución en los costos de producción. Por lo tanto, la elección de un determinado tipo de hidrocoloide en particular depende de aspectos tales como propiedades funcionales, efecto o modo de acción, costos, y de la concentración óptima a utilizar (Tamime y Robinson, 1991; Williams y Phillips, 2000; Lal y col., 2006).

I.3.1.6.2.2. *Clasificación.*

Prácticamente todos los hidrocoloides alimenticios tecnológicamente importantes son de origen animal o vegetal. Pueden clasificarse de la siguiente manera (Spreer, 1991):

- ✓ Pectinas: polisacáridos que se obtienen principalmente del orujo de manzana y de la cáscara de limón.
- ✓ Polisacáridos extraídos de semillas de leguminosas (galactomananos): goma guar, goma espina corona, goma tara.
- ✓ Exudados vegetales: exudados de las cortezas como el caucho, goma arábica, goma “ghatti”.
- ✓ Extractos de algas marinas: de algas rojas (agar-agar, carragenato) o de algas pardas (alginatos).
- ✓ Almidón y derivados de almidón.
- ✓ Derivados sintéticos de la celulosa.
- ✓ Polisacáridos fermentativos de las transformaciones microbiológicas: goma xantano.
- ✓ Hidrocoloides animales: gelatina, caseinatos.

I.3.1.6.2.3. *Galactomananos.*

Los galactomananos son polisacáridos que están presentes en las paredes celulares de los tejidos de almacenamiento de las semillas (como el endosperma). Se obtienen de las semillas de distintas leguminosas; están formados por una cadena de manosas unidas entre sí por enlaces β (1 \rightarrow 4), en la mayoría de los casos con ramificaciones formadas por unidades de galactosas unidas a las manosas por un enlace α (1 \rightarrow 6). Dependiendo del vegetal del que se extraigan, los galactomananos tiene distintos grados de ramificación y esto influye sobre sus propiedades físico-químicas (Bolívar Forero, 2009).

Se utilizan principalmente en la industria de los alimentos, donde son conocidos como “polisacáridos alimenticios”, debido a que contribuyen significativamente a la ingesta de fibra y además se usan como aditivos espesantes y/o estabilizantes (Bolívar Forero, 2009).

Entre las gomas vegetales comúnmente utilizadas que se emplean para aumentar la viscosidad de los productos alimenticios, se destacan: la Goma Guar (*Cyamopsis tetragonoloba*), con una relación de manosa/galactosa (M/G) de 2:1 y la goma de Algarrobo europeo o Goma Garrofín (*Ceratonia siliqua*), con 4:1 de relación M/G. La solubilidad del galactomanano depende mucho del contenido de galactosa; la Goma de Guar es soluble en agua fría, y en cambio, para disolver la Goma Garrofín es necesario calentar al menos hasta los 80° C (Bolívar Forero, 2009). Las gomas son utilizadas principalmente para ofrecer resistencia a fenómenos físicos indeseables como cristalización, sedimentación gravitacional, y desagregación mecánica, que pueden ocurrir durante la distribución y almacenamiento de los productos (Marcotte y col., 2001). Mientras que la demanda de nuevas fuentes de hidrocoloides se ha incrementado, el volumen de estos ingredientes solicitado depende de la seguridad de su suministro, la calidad y el precio de los mismos (Koocheki y col., 2009). Consecuentemente, existe un mercado óptimo para nuevas gomas que sustituyan algunos de estos hidrocoloides importados, por un mejor precio y disponibilidad o para complementar los mismos generando sinergias que mejoren las propiedades reológicas y texturales de los productos. En este contexto, el empleo de Goma Espina Corona se avizora como una interesante alternativa de gomas comerciales nacionales.

I.3.1.6.2.3.1. *Goma Espina Corona.*

La Goma Espina de Corona (GEC), es extraída de las semillas de la leguminosa *Gleditsia amorphoides*, especie que crece en los bosques y selvas del Norte de la República Argentina, abarcando las provincias de Chaco, Formosa, Corrientes, Misiones, Entre Ríos, Norte de Santa Fe, Salta y Jujuy (Spotti y col., 2012).

Es un polímero no iónico, cuya composición química corresponde a un galactomanano con una relación 2,5:1 de M/G (figura I.5.). Esta relación es cercana a la descrita anteriormente para la Goma Guar (2:1) (Cerezo, 1965).

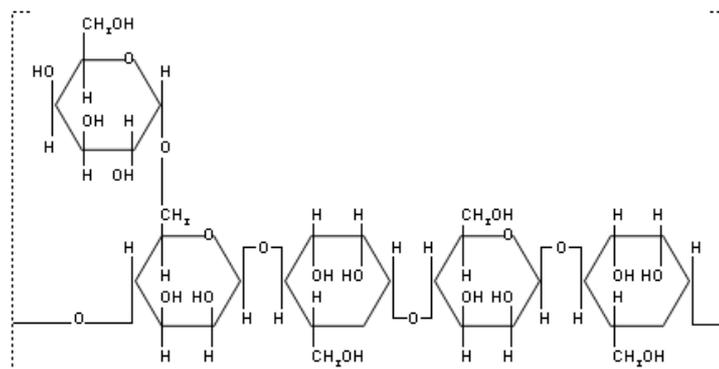


Figura I.5. Estructura química de la goma espina corona (Fuente: www.naturegum.com).

Este aditivo se incluye en el Código Alimentario Argentino, Art.1368, Inc. N° 73 (2010), como *Espesante y Estabilizante*.

La GEC cuenta con aproximadamente un 70% de hidratos de carbono en su composición (Hollowski, 2011). Se dispersa e hidrata casi completamente en agua fría y completamente en agua caliente, formando dispersiones muy viscosas, pero no es soluble en solventes orgánicos. Es un polímero no iónico compatible con la mayoría de otros hidrocoloides vegetales (Goma Guar, Tragacanto, Arábiga, Agar, Alginatos, entre otros) y con casi todos los almidones químicamente modificados, polímeros sintéticos, y proteínas solubles en agua (www.naturegum.com).

Desde el punto de vista botánico, la espina corona es una especie forestal autóctona muy cercana al algarrobo europeo, de cuyas semillas se extrae la goma garrofín. Esta similitud motivó su estudio por partes de investigadores (Rothman y Riqué, 1959), quienes concluyeron que no existen diferencias físicas, químicas, mecánicas ni tecnológicas significativas entre el hidrocoloide obtenido a partir de EC con el producto importado goma garrofín (Maiochi, 2006).

Actualmente, su desarrollo a nivel nacional se revitaliza por razones de costos de productos similares de origen extranjero como gomas guar y garrofín. Está confirmada la existencia de un importante y estable mercado nacional e internacional para éste tipo de gomas, pudiendo la GEC ingresar a ese mercado, si demuestra economicidad y confiabilidad en el suministro de materia prima. Existe un adecuado potencial de producción de semilla, a partir de las existencias de árboles en el bosque natural. Hay un gran potencial de investigación para optimizar las condiciones de producción de semilla e incorporar nuevas tecnologías que permitan bajar costos y asegurar continuidad en la producción. Sería de gran importancia localizar y recoger la numerosa información

dispersa sobre esta materia, que sin duda existe en archivos oficiales y privados, a partir de los estudios de Riqué y Pardo (1959).

Por ende, podría sustituir ambos aditivos, importados, posibilitando un desarrollo industrial sustentable, principalmente en la región chaqueña Argentina, generando fuente de trabajo formal, disminuyendo el desempleo en una de las regiones más pobres del país.

I.3.1.6.2.4. *Almidones.*

Las propiedades espesantes del almidón tienen un efecto positivo en las características organolépticas de los productos alimenticios y además, desempeñan importantes funciones tecnológicas/funcionales en la preparación de los alimentos (Early, 2000). Son utilizados en la manufactura de yogur para incrementar su viscosidad, textura, mejorar su *mouthfeel* y prevenir la sinéresis (Goncalvez y col., 2006, Kaur, 2011). Es uno de los agentes espesantes más utilizados en la fabricación del yogur por su fácil procesamiento y bajo costo comparado con otros hidrocoloides (Goncalvez y col., 2006).

I.3.1.6.2.4.1. *Almidones nativos y modificados.*

Los almidones nativos son polisacáridos constituidos por dos tipos de moléculas: amilosa y amilopectina. La amilosa es un polímero lineal de unidades de glucosa unidas por enlaces α -1,4 glucosídicos, mientras que la amilopectina es una molécula ramificada y de mayor tamaño, formada por monómeros de glucosa unidos por enlaces α -1,4 glucosídicos y α -1,6 en los puntos de ramificación (McMurry, 2008). La relación amilosa/amilopectina depende del origen vegetal del almidón y es uno de los determinantes de las propiedades del mismo (Early, 2000).

Cuando los almidones nativos se calientan y gelifican, las moléculas de amilosa tienden a unirse entre sí formando agregados cristalinos. Este fenómeno, conocido como retrogradación, opaca la solución y origina un gel rápido que puede contraerse expulsando el agua libre (Spreer, 1991; Early, 2000). En general, los alimentos con almidones nativos tienen una escasa resistencia a los procesos productivos y estabilidad reducida durante el almacenamiento. El procesamiento industrial típico conlleva a una pérdida de viscosidad y menor textura (Mason, 2009).

Es por esto que se han desarrollado técnicas para superar los defectos de los almidones nativos e incrementar su utilidad. La modificación de los almidones no sólo

disminuye la retrogradación y la consecuente sinéresis, sino que además mejora la claridad y el brillo de la pasta y garantiza la consistencia deseada (Mason, 2009; Kaur y col., 2011).

En la actualidad la modificación de almidones puede llevarse a cabo de forma química, física, enzimática o genética (Kaur y col., 2011). Entre los métodos de modificación química, el más ampliamente utilizado es el entrecruzamiento (*cross-linked*), donde se utilizan reactivos bi- o polifuncionales que generan enlaces covalentes entrecruzados entre las moléculas de almidón, reforzando los gránulos y minimizando su rotura, sin alterar su valor nutritivo. El entrecruzamiento controla el hinchamiento de los gránulos, generando de ese modo almidones que pueden tolerar altas temperaturas, bajo pH y elevado cizallamiento (Early, 2000, Lewandowicz y col., 2004).

I.3.1.6.2.4.2. *Almidón modificado de mandioca.*

El almidón nativo de mandioca presenta características de particular interés en el ámbito industrial como, por ejemplo, una alta pureza, sabor neutro y suave, fácil hinchamiento y solubilidad, desarrollo de viscosidad considerable y una baja tendencia a retrogradar debido a su alto contenido en amilopectina (Early, 2000; González Parada y Perez Sira, 2003; Mason, 2009). La estabilidad del gel del almidón de mandioca es más alta comparada con la de los geles de los almidones a base de cereales, y por eso, se prefiere para muchos productos comestibles, sobre todo cuando tienen que ser almacenados por largo tiempo (Gottret y col., 1997).

Sin embargo, a pesar de todas estas características, se hace necesaria la modificación de este almidón para lograr una mayor versatilidad de uso, a fin de responder satisfactoriamente a las tecnologías de procesamiento disponibles en la actualidad (González Parada y Perez Sira, 2003). El almidón de mandioca modificado produce geles muy estables, de suave *flavor* y resistentes a la agitación, temperaturas elevadas y pH (González Parada y Perez Sira, 2003; Mason, 2009).

I.3.1.6.2.5. *Gelatina.*

La gelatina es una proteína animal, soluble en agua, derivada de la hidrólisis del colágeno insoluble. Se obtiene mediante extracción ácida o alcalina a partir de piel de cerdo, vaca, o de los huesos (Early, 2000).

Los geles de gelatina son blandos, elásticos y en la mayoría de los casos libres de color; funden en la boca para proporcionar una excelente sensación bucal (*mouthfeel*) y

percepción aromática. La gelatina, que debe enfriarse para que gelifique, tiene una baja susceptibilidad a la rotura por ácido y produce geles con un punto de fusión bajo, que facilita su preparación y su disolución en la boca (Smewing, 2001).

Se aplica en productos lácteos refrigerados, tales como yogur y productos cuajados, untables, crema estabilizada y quesos. En los mismos, la gelatina tiene propiedades gelificantes y estabilizantes, contribuye a mejorar la textura y da estabilidad durante el almacenamiento. Además, actúa como un coloide protector y evita la sinéresis. También, participa en la graduación de la consistencia de los yogures, desde cremosa hasta firme (Fizman y Salvador, 1999; Ganesh, 2006).

I.3.1.6.3. *Citrato de calcio.*

Es evidente que no hay una única fuente de calcio para fortificar los productos, sino más bien una gama de posibilidades diferentes que pueden ser utilizados comercialmente con tal fin. De todos los tipos de sales de calcio presentes en el mercado (orgánicas e inorgánicas), el citrato de calcio se plantea como una de las mejores fuentes de este mineral ya que aporta un alto nivel de calcio (21% aproximadamente) (Singh y col. 2007), se absorbe mejor en el intestino, su efecto en el sabor es menos notorio que las demás sales (Gerstner, 2005) y es más soluble a bajas temperaturas, lo cual puede ser una ventaja para el procesado de alimentos en frío (Gerstner, 2002).

El citrato de calcio es absorbido sin tener en cuenta los niveles de ácido gástrico, por lo tanto es altamente biodisponible, y no causa efectos gastrointestinales en los individuos con baja secreción de ácido gástrico (Gerstner, 2002; Singh y col. 2007).

Una preocupación se ha planteado en cuanto al efecto de la suplementación de este mineral, a largo plazo, en la formación de cálculos renales y cálculos en los conductos urinarios. Sin embargo, se ha demostrado, que el citrato de calcio sería capaz de evitar la cristalización de las sales de calcio, y por ende, se evitaría la formación de cálculos renales (Labin-Goldscher y Edelstein, 1996).

I.3.1.6.4. *Conservantes.*

El ácido láctico ejerce un efecto protector porque inhibe el desarrollo de muchos microorganismos alterantes o patógenos; por esta razón, los productos lácteos fermentados se conservan durante más tiempo. Sin embargo, el bajo pH del medio no impide el crecimiento de mohos y levaduras, que alteran el sabor y aroma característicos. Para contrarrestar este efecto el conservante más empleado es el ácido

sórbico. Éste es añadido en forma de su sal, sorbato potásico, en una concentración máxima de 0,03%. Actúa selectivamente sobre levaduras y mohos y no afecta a los microorganismos del fermento (Early, 2000; Multon, 2000).

I.3.1.6.5. Aromatizantes.

Las esencias o aromas son productos que contienen sustancias aromáticas concentradas, que han sido elaborados por concentración de alimentos o de aditivos, y cuya finalidad es conferir a los alimentos un determinado sabor o aroma. Se suelen incorporar después de la primera refrigeración de la LF y antes del envasado (Spreer, 1991; Early, 2000).

I.3.1.6.6. β -ciclodextrina.

Las ciclodextrinas (CD) son oligómeros cíclicos constituidos por seis (α -ciclodextrina), siete (β -ciclodextrina, β -CD) u ocho (γ -ciclodextrina) moléculas de glucosa unidas por enlaces α (1 \rightarrow 4). Son producidas durante la degradación enzimática del almidón; cuando éste se trata con una enzima en particular, la *ciclodextrina glicosiltransferasa* de ciertas bacterias (*Bacillus macerans*), se rompen las cadenas de amilosa, y con los fragmentos se forman anillos, que reciben el nombre de ciclodextrinas (Astray y col., 2009). Estas moléculas poseen una estructura cónica rígida con un interior hidrofóbico y un exterior hidrofílico, como se observa en la figura I.6.

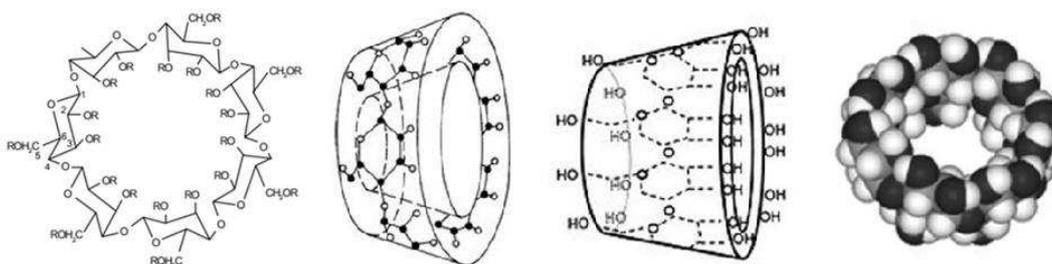


Figura I.6. Estructura de ciclodextrinas. (Fuente: Ciudad atómica, 2011).

Las CDs presentan diferente solubilidad en agua. La β -CD es la que muestra menor solubilidad (1,85 g/100 mL a 25 °C) (Astray y col., 2009).

La característica de la β -CD de poseer la menor solubilidad acuosa, comparada con las demás CDs, favorece a que los complejos formados, por ejemplo con el colesterol, sean más fáciles de separar del resto del producto sin que se altere en absoluto la composición y las propiedades nutricionales de la materia prima (Szejtli, 2004).

La β -CD es la que presenta mayor afinidad para la formación del complejo con colesterol. Las constantes de asociación CD-colesterol dependen en forma importante de la presencia y características de cadenas laterales en el oligómero (Toro Vergara, 2006). La β -CD es no tóxica, comestible, no higroscópica y químicamente estable. Se considera un compuesto GRAS. Así, la β -CD provee una ventaja cuando es usada para remover el colesterol en la leche, de donde se ha logrado extraer hasta en un 95 % (Lee y col., 1999; Shim y col., 2003).

I.3.2. TECNOLOGÍA PARA LA PRODUCCIÓN.

A continuación se describen brevemente las principales operaciones del proceso productivo.

I.3.2.1. Preparación de la “mezcla base”.

La elaboración de una leche fermentada comienza por la mezcla de todos los ingredientes que constituyen la mezcla base. Los ingredientes que se incorporan en polvo (leche en polvo, estabilizantes, azúcares) necesitan cierto tiempo para rehidratarse y desairarse (Early, 2000).

Los contenidos de grasa y de sólidos no grasos deben estandarizarse para asegurar el cumplimiento de las normativas legales (Tamime, 2002).

El objetivo de aumentar el porcentaje de sólidos no grasos, más concretamente el porcentaje de proteínas, es conseguir un producto con las propiedades reológicas deseadas. Cuanto mayor sea el contenido de extracto seco magro de la mezcla destinada a la elaboración de LF, mayor consistencia y viscosidad, y menor tendencia a la sinéresis, tendrá el producto final. Una LF de buena calidad se obtiene a partir de leche con un extracto seco total de 14-16% (Tamime y Robinson, 1991). Esto se logra generalmente mediante la adición de leche en polvo descremada, de WPC; o por concentración por evaporación o filtración (Tamime y Robinson, 1991; Gösta Bylund, 2003).

I.3.2.2. Tratamiento térmico.

El tratamiento térmico de la leche induce numerosos cambios químicos y físicos complejos. Los efectos del calentamiento térmico son:

- destrucción y/o eliminación total de patógenos y de otros microorganismos presentes en la leche base. De esta manera, la leche procesada proporciona un medio de

crecimiento bueno para los cultivos iniciadores y probióticos, además de eliminar un riesgo para la salud de los consumidores (Tamine, 2002);

- cambios en las propiedades fisicoquímicas de los constituyentes de la leche, principalmente la desnaturalización de la β -lactoglobulina, la cual forma un complejo con la κ -caseína; tal interacción minimiza la sinéresis y mejora la firmeza del gel (Tamine, 2002);

- producción de componentes que son estimuladores de los cultivos estárter, como la lactulosa y el ácido fórmico, que elevan la velocidad de acidificación (Tamine, 2002);

- reducción del potencial redox de la leche debido a la eliminación parcial del oxígeno disuelto y a la producción de grupos sulfhidrilos libres por la desnaturalización de las proteínas, lo cual favorece el crecimiento de *L. bulgaricus*.

En el proceso productivo se realizan dos tratamientos térmicos, el primero, la pasteurización que se realiza a 75 °C durante 15 segundos, que persigue como objetivo no solo la destrucción de las formas vegetativas sino también acondiciona la leche para la homogenización y el segundo, se realiza a 90 °C durante 5 minutos, más intenso, para eliminar las formas vegetativas y probablemente algunos esporos, y también desnaturaliza proteínas acondicionando la “mezcla base” para la fermentación.

I.3.2.3. Homogeneización.

En la industria láctea se utiliza este proceso, esencialmente para reducir el tamaño de los GG, consiguiendo que todos tengan un diámetro uniforme de 0,5 – 1 μm (Spreer, 1991).

El principio de funcionamiento consiste en hacer pasar la leche a elevada presión a través de estrechas hendiduras cuyas medidas sean menores que las de los GG. De esta manera, los GG se deforman y se rompen dando lugar a la grasa “desnuda” (figura I.7.a). Consecuentemente, el área superficial total se incrementa y, como las membranas de los GG originales no bastan para cubrir la superficie del mayor número de glóbulos, se adsorben surfactantes adicionales, como por ejemplo las proteínas de la leche (principalmente caseínas), que conformarán la nueva membrana de dichos glóbulos. Los factores que influyen, principalmente en este tratamiento son: presión, temperatura, caudal volumétrico y forma de la tobera del homogeneizador. Se cumple que cuánto más bajo sea el contenido de grasa, y cuánto más altas sean la temperatura y la presión, mayor será el efecto homogeneizador. La temperatura óptima oscila entre los 60 y 75 °C

(Spreer, 1991). La homogeneización puede hacerse en dos etapas, con lo cual se obtiene una óptima eficiencia, ya que la primer etapa (primer válvula) principalmente atomiza (produce la disminución el tamaño de los glóbulos grasos), y la segunda etapa (segunda válvula) principalmente separa las partículas que se hayan reagrupado (uniforma el tamaño de los glóbulos grasos obtenidos) (figura I.7.b), consiguiendo una emulsión con mayor estabilidad (Ordóñez, 1998).

La homogeneización persigue diferentes propósitos en función del producto del que se trate. En el caso de las LF, se trata de mejorar la consistencia y el sabor, de conseguir la formación de un gel de acidificación y de reducir el desprendimiento de lactosuero en el yogur y en otros productos cuajados (Spreer, 1991). Varios cambios químicos y físicos ventajosos son causados por la homogeneización de la mezcla base durante la elaboración de leche fermentada, tales como: a) aumento de la viscosidad de los productos debido a la interacción y/o adsorción de los glóbulos grasos con las micelas de caseína; b) disminución de la sinéresis del gel y c) capacidad de retención de agua como resultado de la interacciones de las proteínas (Tamime, 2002).

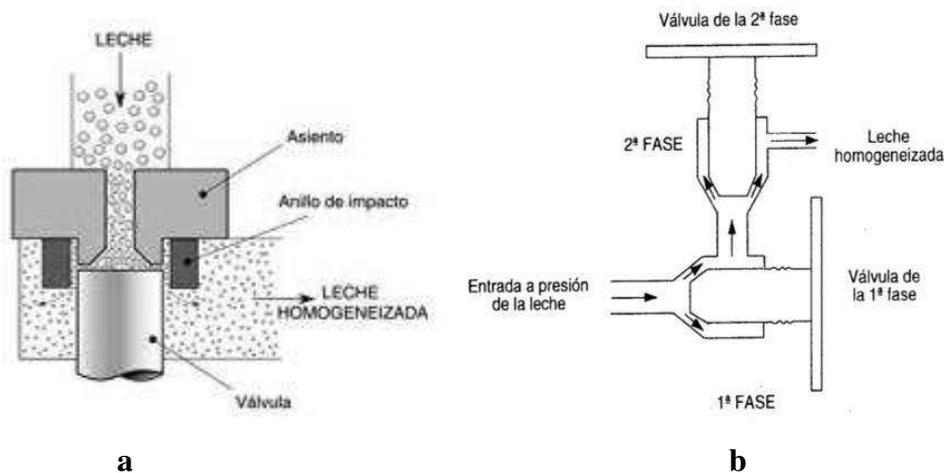


Figura I.7. Representación del proceso de homogeneización de la leche (a) y esquema del funcionamiento de un homogeneizador de dos etapas (b) (Fuente: Gösta Bylund, 2003; Ordóñez Pereda, 1998).

En el presente trabajo, se realizan 2 homogeneizaciones en diferentes etapas del proceso productivo, con fines diversos. La primera homogeneización se realiza con el objetivo principal de optimizar la remoción del colesterol, atomizando los GG y liberando las moléculas de colesterol, desde su interior (80% del total), para favorecer su interacción con la β -CD (Lee y col., 1999). En cambio, la segunda homogeneización que se efectúa una vez finalizada la fermentación, se realiza a bajas presiones, con el

objetivo de obtener una distribución uniforme de los ingredientes añadidos y una textura más suave, lisa, brillante y estable del coágulo obtenido (Early, 2000).

I.3.2.4. Extracción de colesterol con β -CD.

La β -CD, al presentar un exterior hidrofílico, que le confiere solubilidad en agua, y una cavidad central hidrofóbica puede alojar moléculas orgánicas no polares en la misma (como es el caso del colesterol) (Toro Vergara, 2006; Astray y col., 2009).

Estas características son las que permiten a la β -CD formar complejos de inclusión, al igual que las demás CDs. Se cree que estos complejos anfitrión-huésped se forman gracias a las interacciones hidrofóbicas y dipolo-dipolo, así como a la acción de las fuerzas de van der Waals y enlaces puente de hidrógeno; es decir, las interacciones son de tipo no covalente (Astray y col., 2009).

Para la formación del complejo de inclusión es necesario que exista compatibilidad de tamaño y forma entre la β -CD y el sustrato. Durante la formación del complejo de inclusión se produce un desplazamiento de moléculas de agua por parte del sustrato, desde la cavidad interior de la β -CD hacia el exterior, lo que genera un aumento en la entropía del sistema, favoreciendo así la formación del complejo de inclusión (Astray y col., 2009). Por su parte, el colesterol es una molécula cuyo ancho es compatible con la cavidad de la β -CD, mientras que su largo es aproximadamente el triple que el largo de mencionada cavidad. Es por esto que es posible encontrar complejos de inclusión colesterol/ β -CD en proporciones 1:1, 1:2 o inclusive 1:3, siendo ésta última la más frecuente y estable (Gimpl, 2010). Debido a su carácter anfipático, la molécula de colesterol acomoda su porción hidrofóbica dentro de la cavidad de la β -CD, dejando su cabeza polar (el grupo hidroxilo) fuera de la misma (Davis y Higson, 2011). En la figura I.8., se esquematiza el complejo de inclusión colesterol/ β -CD en proporción 1:3.

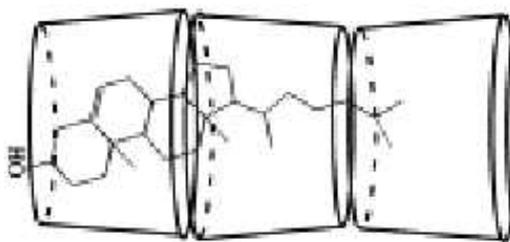


Figura I.8. Representación esquemática del complejo de inclusión colesterol/ β -CD en proporción 1:3 (Fuente: Yamamoto y col., 2005).

Los complejos β -CD - colesterol son insolubles en el agua o en la grasa por lo que son removidos del material tratado mediante filtración o centrifugación, obteniéndose de esta manera un producto final sin la presencia del complejo (Hedges, 1998).

La eficiencia de este proceso depende de varios factores, como ser la concentración de β -CD, el tiempo y la temperatura de mezclado, las condiciones de homogeneización inicial y de separación del complejo (centrifugación) (Lee y col., 1999). A su vez, esta asociación se ve favorecida a bajas temperaturas por ser un proceso exotérmico (Yamamoto y col., 2004).

Diversos estudios han demostrado que el tratamiento con β -CD no afecta la composición lipídica de la leche, manteniéndose inalterables las cantidades de ácidos grasos insaturados, CLA, vitamina D y fosfolípidos. Estos resultados indican cierta especificidad en la remoción del colesterol, conservando las propiedades nutricionales de la materia grasa de la leche tratada (Alonso y col., 2009).

I.3.2.5. Fermentación.

La fermentación comienza con la adición del cultivo iniciador a la mezcla base tratada térmicamente, la cual previamente debe enfriarse a la temperatura óptima de crecimiento del cultivo, normalmente de 40–45°C (Spreer, 1991; Gösta Bylund, 2003). Durante el período de incubación, que suele ser entre 3 y 5 horas, la leche debe mantenerse en reposo para lograr una óptima formación del gel (Spreer, 1991; Early, 2000).

El coágulo de yogur comienza a formarse cuando las BAL metabolizan la lactosa produciendo ácido láctico. La acidificación de la leche provoca la desestabilización de las micelas de caseína por solubilización del fosfato cálcico y de los citratos, lo que ocasiona la asociación y coalescencia de las micelas a medida que el pH se aproxima a su punto isoeléctrico, es decir, 4,6. La interacción de la β -lactoglobulina y la α -lactoalbúmina con la κ -caseína protege parcialmente a las micelas de una ruptura completa, por lo que se forma una red con estructura regular que atrapa en su interior al resto de los componentes de la mezcla base, incluyendo la fase acuosa (Tamime y Robinson, 1991; Alais, 2003). En este proceso se intenta conseguir una viscosidad elevada para impedir que el gel pierda suero y para que el producto adquiera su consistencia típica (Spreer, 1991). A mayor contenido de sólidos de leche, las micelas formadas por la caseína tienden a ser de menor tamaño, formando aglomerados y

cadena que componen una matriz más eficiente para la formación del gel (López y col., 2004).

Durante la fermentación, las BAL producen compuestos responsables del *flavor* del yogur, tales como ácidos volátiles y no volátiles, acetaldehído, acetona, entre otros (Tamime y Robinson, 1991).

I.3.2.6. Enfriamiento y conservación.

El objetivo principal del enfriamiento es el de controlar la actividad metabólica de los cultivos iniciadores y de sus enzimas (Tamime, 2002).

El enfriamiento se ha de realizar con la mayor rapidez posible para evitar que la LF siga acidificándose. Sin embargo, un enfriamiento muy rápido puede afectar a la estructura del coágulo; puede ocasionar la separación del suero debido a una intensa retracción de las proteínas del coágulo que afecta, a su vez, a la retención de agua de las mismas. Se recomienda que se realice en fases sucesivas, primero rápida hasta 30 °C, después lentamente a 20 °C, más tarde a 15 °C, hasta llegar a 4 °C. Así se consigue la mejor textura sin permitir una excesiva acidificación (Ordóñez y Pereda, 1998).

El almacenamiento es la etapa final durante la cual, de no realizarse en las condiciones adecuadas (< 5 °C), aparecen defectos que pueden alterar ostensiblemente el producto final, pudiendo producir el rechazo del mismo por parte de los consumidores con las consiguientes pérdidas económicas y de imagen (Spreer, 1991). Se debe tener en cuenta que las variaciones de temperatura durante el período de conservación producen modificaciones en la textura y viscosidad, originan la separación del suero y favorecen el desarrollo de microorganismos alterantes (Early, 2000).

Si la producción y conservación se llevan a cabo en condiciones asépticas, el producto se mantiene durante 4 - 6 semanas a temperaturas de refrigeración (Spreer, 1991).

I.4. ESTUDIOS DE CALIDAD Y ESTABILIDAD EN LECHE FERMENTADAS.

La calidad de un producto puede definirse en función de un gran número de criterios, incluyendo sus características físicas, químicas, microbiológicas, sensoriales y

nutricionales que en conjunto determinarán su aceptación por parte de los consumidores. Debe seguirse rigurosamente el control de la calidad para garantizar que el producto sea apto para el consumo humano, que cumpla con las especificaciones legales y que sea capaz de conservar sus características durante la vida de anaquel (Tamime y Robinson, 1991). De esta forma, los ensayos composicionales, reológicos, sensoriales, texturales, retención de agua, permiten no sólo la caracterización de las LF sino el estudio de la calidad y estabilidad de las mismas.

I.4.1. REOLOGÍA.

I.4.1.1. Conceptos generales.

I.4.1.1.1. Reología y comportamiento de los materiales.

La **reología** es una disciplina que estudia y describe cómo se deforman los cuerpos, sólidos o fluidos, cuando se someten a fuerzas externas, denominándose **fluido** a toda sustancia que se deforma continuamente cuando se somete a un esfuerzo cortante (Martínez Icarte, 2002). Según Ramírez Navas (2006), es la “ciencia del flujo y la deformación”.

Los materiales presentan una gama de comportamientos que dependen tanto de sus características fisicoquímicas intrínsecas, como del tamaño y modo del esfuerzo al que son sometidos (Ortega Rodríguez, 2009). De esta forma, los materiales pueden ser definidos reológicamente a través de los términos **viscoso**, **elástico** y **viscoelástico**.

✓ Material viscoso: un fluido viscoso ideal es incapaz de almacenar cualquier energía de deformación. Éste es deformado irreversiblemente cuando se lo somete a cualquier esfuerzo; fluye y la energía de deformación se disipa como calor. Los gases y los líquidos se describen normalmente como este tipo de fluidos (Gösta Bylund, 2003).

✓ Material elástico: un material elástico ideal almacena toda la energía de deformación que se le imponga y una vez liberado del estrés se recuperará totalmente. Los sólidos presentan normalmente este comportamiento (Gösta Bylund, 2003; Sharma y col., 2003).

✓ Material viscoelástico: son materiales que muestran propiedades viscosas, elásticas y/o más frecuentemente una combinación de ambas (Osorio Tobón y col., 2005), ya que almacenan parte de la energía de deformación en su estructura, mientras

que otra parte la pierden mediante flujo. Existen muchos ejemplos entre los diferentes alimentos: queso, leches fermentadas, etc. (Gösta Bylund, 2003).

I.4.1.1.2. *Parámetros reológicos: esfuerzo de corte (τ), gradiente de deformación ($\dot{\gamma}$) y viscosidad (μ).*

Para poder analizar el comportamiento reológico se deben especificar las condiciones en las que se efectúan las determinaciones y la temperatura del producto en cuestión, ya que dicho comportamiento es dependiente de las condiciones experimentales. Además, los parámetros reológicos más importantes a tener en cuenta son el esfuerzo de corte (τ), la velocidad de corte o gradiente de deformación ($\dot{\gamma}$) y la viscosidad (μ) (Muller, 1978). Para definir estos parámetros se utiliza normalmente la inducción del movimiento de capas de producto, unas sobre otras, provocando el flujo entre planos paralelos (figura I.9.) (Gösta Bylund, 2003; Sharma y col., 2003).

Cuando un fluido es confinado entre dos placas paralelas de dimensiones infinitas donde la placa inferior se mantiene fija y la fuerza F se aplica sobre la placa superior para producir una velocidad v , lo que resulta es un perfil de velocidad dentro del fluido. La velocidad cerca de la lámina fija es cero, en tanto que el líquido cerca de la lámina superior se estará moviendo a una v dada en m/s (Sharma y col., 2003).

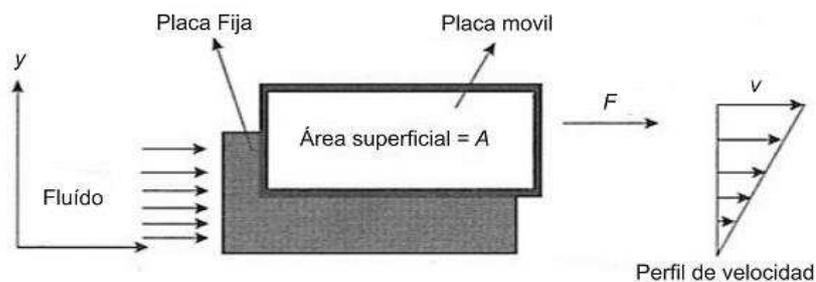


Figura I.9. Representación de un fluido newtoniano que fluye entre una placa inferior fija y una superior móvil (F = fuerza aplicada sobre la placa superior, v = velocidad del fluido en movimiento) (Fuente: Sharma y col., 2003).

La fuerza de corte (F) sobre el área (a) tendrá un esfuerzo cortante o de corte (τ). El esfuerzo de corte se define como la fuerza por unidad de área necesaria para alcanzar una deformación dada (ec. 1) (Ibarra Corral, 2007):

$$\tau = F / a \tag{ec. 1}$$

$$[\tau]: \text{N/m}^2 = \text{Pa}$$

Como la distancia entre la placa es “ y ”, el gradiente de velocidad o de deformación ($\dot{\gamma}$) se describe como dv/dy y se define como el cambio de velocidad v a través de la distancia “ y ” entre las dos placas (ec. 2). Representa una medida de la velocidad de deformación o de la velocidad de corte que se está aplicando al fluido (Ibarra Corral, 2007).

$$\dot{\gamma} = dv / dy \quad (\text{ec. 2})$$

$$[\dot{\gamma}] = \text{m} \cdot \text{s}^{-1} / \text{m} = \text{s}^{-1}$$

La **viscosidad** (μ) es un parámetro intrínseco y *es una medida de la resistencia interna de un líquido a fluir originada por las fuerzas de corte que se le imponen*. Matemáticamente, se define como la relación entre el esfuerzo de corte impartido y el gradiente de deformación adoptado por el fluido (ec. 3) (Gösta Bylund, 2003; Sharma y col., 2003).

$$\mu = \tau / \dot{\gamma} \quad (\text{ec. 3})$$

$$[\mu] = \text{Pa} / \text{s}^{-1}$$

Por lo tanto, las propiedades reológicas se definen a partir de esta relación, de cómo un material responde dinámicamente al someterse a un sistema de fuerzas externas. Este sistema de fuerzas se representa matemáticamente mediante el esfuerzo de corte, mientras que la respuesta dinámica del fluido se relaciona con el gradiente de deformación, lo que permite la cuantificación del comportamiento reológico con diferentes modelos (Rozycki y Seguro, 1995).

I.4.1.1.3. Clasificación de fluidos.

A partir de la definición de viscosidad podemos realizar una nueva clasificación, dependiendo de si la misma permanece constante o no para los sistemas en estudio.

I.4.1.1.3.1. Fluidos newtonianos.

En los **fluidos newtonianos** existe *proporcionalidad constante entre el esfuerzo de corte y la velocidad de deformación*. De esta forma, un fluido Newtoniano puede definirse mediante un único valor de viscosidad para una determinada temperatura, denominada *viscosidad verdadera* (μ) (Muller, 1978; Gösta Bylund, 2003). Hay que

tener en cuenta también que la viscosidad de un fluido newtoniano no depende del tiempo de aplicación del esfuerzo, aunque sí puede depender tanto de la temperatura como de la presión a la que se encuentre. Muchos materiales alimenticios como leche, jugo de manzana, jugo de naranja, vino y cerveza tienen un comportamiento newtoniano (Ramírez Navas, 2006).

I.4.1.1.3.2. *Fluidos no newtonianos.*

En los **fluidos no newtonianos** *no hay proporcionalidad constante entre el esfuerzo de corte y la velocidad de deformación.* Ya no se puede hablar de la “viscosidad del fluido”, porque ésta no tiene un único valor. Según la velocidad de deformación que se aplique, la viscosidad será diferente. En estos casos, se habla de **viscosidad aparente** (μ_{ap}) y se calcula con los datos empíricos. En la práctica, si se citan las viscosidades aparentes de fluidos no newtonianos, es necesario definir las velocidades de deformación que fueron aplicadas en el desarrollo del ensayo (Rosenthal, 2001).

Se dan cuatro tipos generales de comportamiento, que se muestran en la tabla I.5. (Enriquez Castillo, 2012).

Tabla I.5. Clasificación general básica de los fluidos no newtonianos (Fuente: Enriquez Castillo, 2012).

	Independientes del tiempo	Dependientes del tiempo
Dilución	Pseudoplásticos	Tixotrópicos
Espesamiento	Dilatantes	Reopéticos

I.4.1.1.3.2.1. *Fluidos independientes del tiempo.*

Se pueden clasificar dependiendo de si tienen o no esfuerzo umbral (τ_o = límite de fluencia); es decir, si necesitan un mínimo valor de esfuerzo de corte para que el fluido se ponga en movimiento (figura I.10.). Son aquellos para los cuales el tiempo de acción mecánica (bombeo, agitación, etc.) aplicado sobre los mismos no afecta su viscosidad (Rozycki y Seguro, 1995).

a). SIN ESFUERZO UMBRAL:

a.1. **Pseudoplásticos:** *la viscosidad aparente decrece conforme se incrementa el gradiente de velocidad,* debido a que las partículas en suspensión del fluido se deforman y reordenan en el sentido del flujo y/o las cadenas poliméricas se desenredan,

originándose una menor resistencia al mismo (Muller, 1978; Gösta Bylund, 2003; Sharma y col., 2003).

a.2. **Dilatantes:** *la viscosidad aparente aumenta al incrementarse el gradiente de velocidad*, debido a un mayor rozamiento interno entre las moléculas que se hallan en elevada concentración (Muller, 1978; Gösta Bylund, 2003; Sharma y col., 2003).

b). CON ESFUERZO UMBRAL:

b.1. **Plásticos:** si el esfuerzo de corte aplicado es más pequeño que un determinado esfuerzo umbral, el material almacena la energía como deformación, mostrando por ejemplo propiedades elásticas, presentando un comportamiento como un sólido. Una vez que se supera ese esfuerzo cortante umbral, el líquido puede fluir como un fluido Newtoniano denominándose líquido plástico de Bingham o puede fluir como un líquido pseudoplástico denominándose líquido viscoplástico o tipo Casson (Gösta Bylund, 2003; Sharma y col., 2003).

A continuación se muestran los diagramas reológicos de los fluidos newtonianos y no newtonianos independientes del tiempo (figura I.10.).

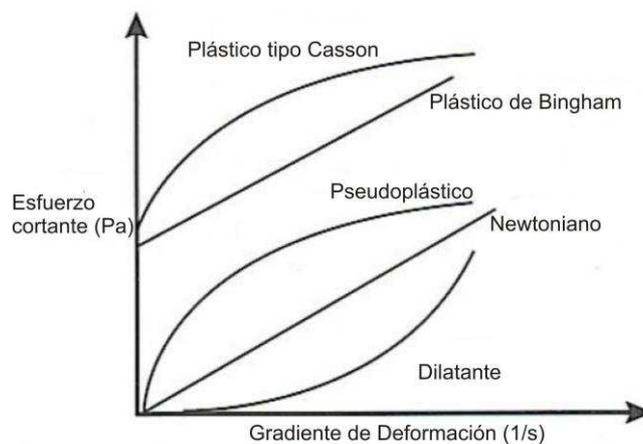


Figura I.10. Curvas de fluidez (τ vs. $\dot{\gamma}$) para fluidos newtonianos y no newtonianos: pseudoplásticos, dilatantes, plástico de Bingham y plástico tipo Casson (Fuente: Sharma y col., 2003).

I.4.1.1.3.2.2. *Fluidos dependientes del tiempo.*

Además de variar con la velocidad de corte, la viscosidad puede variar con el tiempo de aplicación de la cizalla o tratamiento mecánico (figura I.11.). Estos fenómenos se explican por la aparición o rotura de nuevos enlaces o interacciones intermoleculares por la acción del esfuerzo de corte.

a. **Reopécticos:** *la viscosidad aparente se incrementa con el incremento del gradiente de velocidad, pero también se incrementa con el tiempo de acción mecánica aunque el gradiente de velocidad se mantenga constante* (Muller, 1978; Gösta Bylund, 2003; Sharma y col., 2003).

b. **Tixotrópicos:** *la viscosidad aparente decrece no sólo con el aumento del gradiente de velocidad, sino también con el tiempo de cizallamiento o acción mecánica, para un gradiente de velocidad constante* (Muller, 1978; Gösta Bylund, 2003; Sharma y col., 2003).

Este comportamiento se estudia normalmente en una prueba donde el material se somete a gradientes de velocidad crecientes y, a continuación, decrecientes. Si las representaciones de τ en función de $\dot{\gamma}$ son dependientes del tiempo terminan formando ciclo de histéresis (se forma un bucle, fig. I.11.B) (Quintáns Riveiro, 2008). Para intentar recuperar su estructura original, de mayor viscosidad, el material debe quedar en reposo durante cierto tiempo característico de cada material (Gösta Bylund, 2003; Muller, 1978). En el caso de alimentos tixotrópicos, los enlaces químicos de la estructura material se rompen y/o las partículas se alinean conforme continúa la acción cortante (Muller, 1978; Sharma y col., 2003). Este tipo de comportamiento lo presentan principalmente los sistemas gelificantes (Gösta Bylund, 2003).

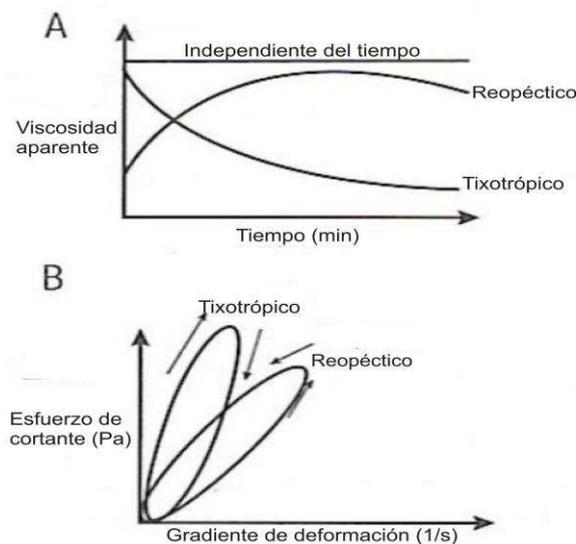


Figura I.11. Comportamiento de los fluidos dependientes del tiempo. A: viscosidad aparente en función del tiempo de cizallamiento; B: esfuerzo de corte vs. gradiente de deformación. (Fuente: Sharma y col., 2003).

Una consecuencia importante de esta dependencia del tiempo es la necesidad de que las medidas rutinarias se efectúen a intervalos de tiempo cuidadosamente elegidos y estrictamente respetados (Quintáns Riveiro, 2008).

Un esquema conciso de los tipos de fluidos existentes en reología es el observado en la figura I.12.

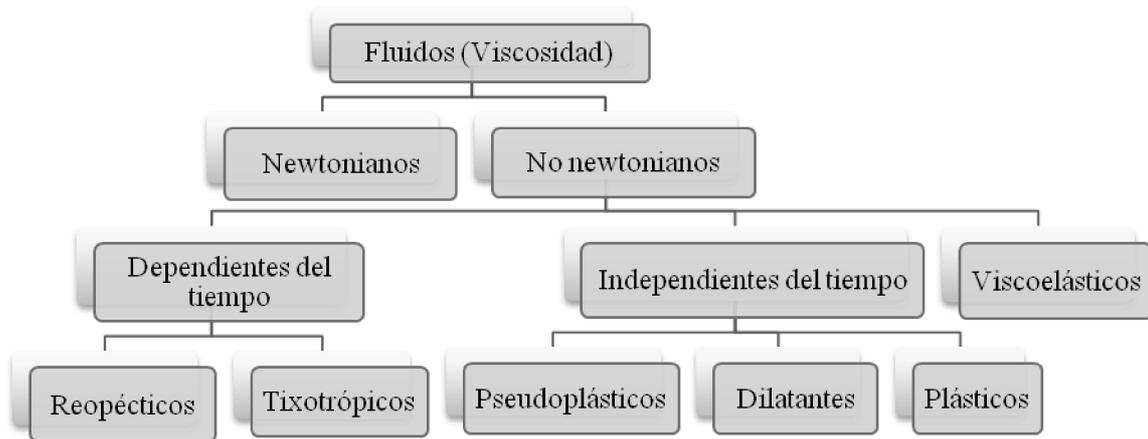


Figura I.12. Clasificación del comportamiento reológico de los fluidos (adaptado de Ramírez Navas, 2006).

I.4.1.1.4. Reometría.

La **reometría** es la ciencia que describe tanto los métodos de medida como los instrumentos que permiten obtener datos reológicos de un material. Determina las relaciones cuantitativas y cualitativas entre la deformación y la tensión mecánica y sus derivadas (Ramírez Navas, 2006).

El reómetro es un instrumento que mide tanto la historia del esfuerzo como la deformación de un material del cual no se conoce su relación constitutiva. El viscosímetro es un caso especial de reómetro que mide únicamente la función de cizallamiento estacionario de la viscosidad (Ramírez Navas, 2006).

A la hora de llevar a cabo las determinaciones reométricas, como por ejemplo, la determinación de la viscosidad aparente, se deben de tener en cuenta dos aspectos: en primer lugar que la viscosidad depende tanto de la velocidad de deformación como de la duración de la deformación, por ese motivo las determinaciones deben hacerse bajo condiciones especiales. El primero de estos aspectos es común a todos los líquidos no newtonianos; el segundo lo es sólo a aquellos cuyo comportamiento depende del tiempo (fenómenos de tixotropía y reopexía) (Quintáns Riveiro, 2008).

Existen numerosos tipos de reómetros, con mecanismos de funcionamiento muy diversos y que miden distintas variables en rangos de deformación o velocidad de cizalla muy diferentes. Suelen agruparse, según su principio de funcionamiento en cuatro grandes grupos: viscosímetros capilares, viscosímetros de cono-placa, viscosímetros de caída de bola y viscosímetros de cilindros coaxiales. A continuación se comentarán las características generales de los del tipo cilindros concéntricos, que se utilizó en este trabajo (Quintáns Riveiro, 2008).

I.4.1.1.4.1. *Viscosímetro de cilindros concéntricos.*

Los viscosímetros más adecuados para efectuar determinaciones con líquidos no newtonianos son los cilindros concéntricos y los de cono y plato. En estos la velocidad de deformación es idéntica en toda la muestra siempre que se minimicen los efectos de extremo, permitiendo modificar de modo controlado la velocidad tangencial variando la velocidad de giro y el tiempo que a cada una de ellas se está operando. Primero se aumenta la velocidad por etapas regulares y luego se disminuye la velocidad del mismo modo. En el de cilindros coaxiales el fluido es cizallado en el espacio comprendido entre los dos cilindros coaxiales de distintos radio. Para todas las geometrías se deben cumplir tres requisitos: que el fluido tenga flujo laminar, que la operación sea isotérmica y que no exista deslizamiento en la interfase sólido-fluido (Quintáns Riveiro, 2008).

El viscosímetro de cilindros concéntricos (figura I.13.) consta de un vaso de medición cilíndrico (de radio R_c) que contiene en su interior un cilindro (de radio R_b) de forma que el fluido queda atrapado en la corona anular que dejan el vaso y el cilindro interior. Durante la operación de medida, el cilindro interior o el vaso gira a una velocidad constante, mientras el otro permanece fijo. En estas condiciones el par transmitido por el elemento móvil hacia el fijo, a través del fluido, será constante (Borda, 2011).

Si es el vaso de medición el que gira, permaneciendo el cilindro interior fijo, se denomina sistema Couette, mientras que si es al revés, es decir, el cilindro interior gira y el vaso permanece fijo se denomina sistema Searle. La transición de flujo laminar a turbulento ocurre a velocidades de giro más elevadas en el sistema Couette que en el Searle.

El flujo viscosimétrico obtenido en los viscosímetros coaxiales corresponde a una cizalla entre placas paralelas, con la particularidad de que las placas son curvadas y forman cilindros de radio variable. Así pues, tanto el esfuerzo cortante como la

velocidad de cizalla serán función del radio, esto es, de la posición del elemento considerado en el espacio entre los dos cilindros. Por esta razón, sólo son comparables los valores de esfuerzo cortante y velocidad de cizalla medidos en la misma posición y se considera aceptable una geometría donde el espacio entre los cilindros no sea mayor al 10 % del radio de los mismos.

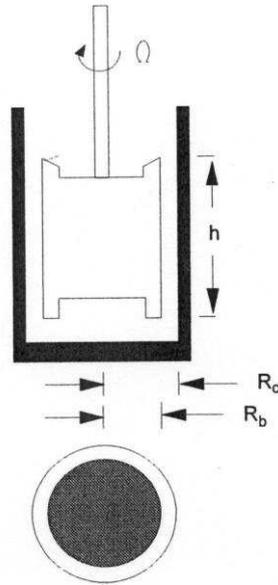


Figura I.13. Esquema de un viscosímetro de cilindros concéntricos. R_c : radio de la copa; R_b : radio del cilindro; h = altura del cilindro. (Fuente: Borda, 2011).

1.4.1.1.5. Modelos de ajuste para fluidos no newtonianos.

El comportamiento reológico de un fluido no newtoniano puede describirse según distintas ecuaciones que relacionan el esfuerzo cortante (τ) con la velocidad de deformación ($\dot{\gamma}$). En la literatura existen numerosos modelos empíricos para describir este comportamiento, dos de los más comúnmente usados son los modelos de **Casson modificado** (ec. 4) y **Herschel y Bulkley** (ec. 5).

$$\tau^{0.5} = \tau_o + k_c \cdot (\dot{\gamma})^{0.5} \quad (\text{ec. 4})$$

donde,

k_c : constante de Casson ; $[k_c] = (\text{Pa}\cdot\text{s})^{0.5}$.

τ_o : yield stress o umbral de fluencia; $[\tau_o] = \text{Pa}$. Es la fuerza mínima requerida para iniciar el flujo (movimiento) y es una medida de la resistencia de la red formada, por interacción entre partículas. La extrapolación de la curva de flujo a un τ cero es una medición indirecta de τ_o (Vanegas Pérez, 2009).

$$\tau = \tau_o + K \cdot (\dot{\gamma})^n \quad (\text{ec. 5})$$

donde,

K : *índice de consistencia*; $[K] = \text{Pa}\cdot\text{s}^n$. Da una medida de la consistencia del producto, se relaciona directamente con la viscosidad del sistema (Vanegas Pérez, 2009).

n : *índice de comportamiento*; $[n] = \text{adimensional}$. Hace relación a la dependencia del comportamiento de flujo con el gradiente de deformación $\dot{\gamma}$. Da una idea de la desviación del comportamiento al flujo respecto al newtoniano (Garza Garza, 1999; Vanegas Pérez, 2009).

La ecuación 5 puede representar, dependiendo de los valores que tomen las constantes, comportamientos newtonianos, plásticos de Bingham, pseudoplásticos y dilatantes. Cuando $n = 1$, el fluido es newtoniano (la viscosidad es constante independientemente del esfuerzo de corte y gradiente de deformación al cual se somete el fluido), cuando $0 < n < 1$ el fluido es pseudoplástico o tixotrópico (la viscosidad disminuye a medida que aumenta el esfuerzo de corte sobre el fluido), cuando $n > 1$ el fluido es dilatante o reopéctico (la viscosidad aumenta a medida que aumenta el esfuerzo de corte al cual es sometido el fluido) (Garza Garza, 1999).

Al no ser lineal la ecuación 5, se presenta la dificultad para calcular los parámetros K y n a partir de la misma. Este inconveniente se puede superar realizando la linealización de la misma utilizando logaritmos en base 10 aplicados miembro a miembro (ec. 6).

$$\log(\tau - \tau_o) = \log K + n \cdot \log \dot{\gamma} \quad (\text{ec. 6})$$

de esta manera se pueden calcular K y n a partir de la ordenada al origen y la pendiente de la recta obtenida, respectivamente.

Por otra parte, los fluidos tixotrópicos pueden ser además ajustados a un modelo empírico conocido como **modelo de Weltmann** (modificado en la presente tesis), su expresión matemática se muestra en la ecuación 7 y permite modelar la evolución de la viscosidad con el tiempo de cizallamiento (Garza Garza, 1999):

$$\mu_a = A + B \cdot \ln t \quad (\text{ec. 7})$$

donde,

μ_a : viscosidad aparente; [μ_a] = Pa.s.

A: resistencia (viscosidad) máxima inicial; [A] = Pa.s. Indica la tensión tangencial (por unidad de superficie), necesaria para que comience a degradarse la estructura que origina la tixotropía (a través de enlaces principalmente no covalentes).

B: coeficiente de ruptura tixotrópica; [B] = Pa.s. Representa la velocidad con que se degrada la estructura durante el cizallamiento (acción mecánica).

1.4.1.1.6. Importancia de las determinaciones reométricas.

El conocimiento adecuado de las propiedades reológicas de los alimentos es muy importante por numerosas razones entre las que se destacan las siguientes:

- diseño de procesos y equipos en ingeniería: el conocimiento de las propiedades de comportamiento al flujo y de deformación de los alimentos son imprescindibles en el diseño y dimensionamiento de equipos tales como cintas transportadoras, tuberías, tanques de almacenamiento, bombas de transporte de fluidos, etc;
- evaluación sensorial: la viscosidad, característica reológica de un fluido, está relacionada con la textura de los alimentos;
- conocimiento de la estructura del producto: a partir de la información reométrica (experimental), se puede inferir sobre la estructura del alimento y las modificaciones de estructura que puede producirse durante el proceso de elaboración (estudio reológico);
- control de calidad de productos intermedios y finales: las propiedades y parámetros reológicos de los modelos se pueden relacionar con la calidad del alimento.

1.4.2. ANÁLISIS SENSORIAL.

El análisis sensorial es una ciencia multidisciplinaria en la que se utilizan panelistas entrenados que utilizan los sentidos de la vista, el olfato, el gusto, el tacto y el oído para medir las características sensoriales y la aceptabilidad de los productos alimenticios, y de muchos otros materiales. No existe ningún otro instrumento que pueda reproducir o reemplazar la respuesta humana; por lo tanto, la evaluación sensorial resulta un factor esencial en cualquier estudio sobre alimentos. El análisis sensorial es aplicable en muchos sectores, tales como desarrollo y mejoramiento de productos, control de calidad, estudios sobre almacenamiento y desarrollo de procesos (Watts, 1992).

Toda prueba que incluya paneles sensoriales debe llevarse a cabo en condiciones controladas, utilizando diseños experimentales, métodos de prueba y análisis

estadísticos apropiados. Solamente de esta manera, el análisis sensorial podrá producir resultados consistentes y reproducibles (Watts, 1992).

La identificación y medición de las propiedades sensoriales es un factor esencial para el desarrollo de nuevos productos alimenticios, reformulación de productos ya existentes, identificación de cambios causados por los métodos de procesamiento, almacenamiento y uso de nuevos ingredientes, así como para el mantenimiento de normas de control de calidad. Este tipo de información cuantitativa orientada al producto, se obtiene llevando a cabo evaluaciones sensoriales en el laboratorio, con paneles entrenados. Cuando se modifica la fórmula de un alimento o se desarrolla una nueva fórmula, las pruebas orientadas al producto preceden a menudo a las pruebas orientadas al consumidor. Estas últimas, son realizadas cuando el objetivo es medir nivel de agrado o aceptación de un producto (Watts, 1992).

Los paneles entrenados se utilizan para identificar diferencias entre productos alimenticios similares o para medir la intensidad de características tales como el sabor (olor y gusto), textura o apariencia. Por lo general, estos paneles constan de 5 a 15 panelistas seleccionados por su agudeza sensorial, los que han sido especialmente entrenados para la tarea que se realizará (Watts, 1992).

I.4.2.1. Tipos de pruebas sensoriales.

Existen tres tipos principales de pruebas sensoriales, y la elección entre una y otra dependerá del objetivo que se pretenda alcanzar en el estudio.

✓ **Pruebas afectivas:** son aquellas en las cuales los jueces expresan su opinión personal y subjetiva sobre un producto, indicando si les gusta o les disgusta, si lo aceptan o lo rechazan, o si lo prefieren a otro producto. Para realizarlas se utilizan jueces no entrenados, que deben ser consumidores habituales o potenciales del alimento a evaluar. Dentro de estas pruebas se distinguen tres tipos de ensayos: las pruebas de preferencia, las pruebas de grado de satisfacción y las pruebas de aceptación (Onega Pagador, 2003).

✓ **Pruebas discriminativas:** en estas pruebas se desea establecer si existe diferencia entre dos o más muestras y, en algunos casos, la magnitud de esa diferencia. Generalmente, se emplean para determinar si una modificación introducida en las materias primas, en el proceso de elaboración o en el almacenamiento, afectan la calidad del producto final. Los paneles suelen estar formados por jueces entrenados (Watts, 1992; Onega Pagador, 2003).

✓ **Pruebas descriptivas:** se pretende definir las propiedades del alimento y medirlas lo más objetivamente posible. En este caso el interés radica en cuál es la intensidad de los atributos del alimento. Estas pruebas proporcionan mayor información que las otras, pero son más complicadas, el entrenamiento de los jueces debe ser más intenso y la interpretación de los resultados es laboriosa. Son utilizadas en la mayoría de las investigaciones sensoriales por ser objetivas y fiables (Onega Pagador, 2003).

En las pruebas descriptivas existen dos metodologías que se aplican en este trabajo:

- **Perfil de flavor:** consiste en los análisis del aroma y el *flavor* percibidos en un producto, su intensidad, el orden de aparición y el regusto o persistencia, mediante un panel de jueces extensamente entrenados. La obtención de atributos se realiza por la técnica de la generación y la selección de descriptores (Onega Pagador, 2003).

- **Perfil de textura:** constituye un acercamiento a la medida de la textura de los alimentos en términos mecánicos, geométricos y de características de grasa y humedad, además del grado de intensidad en que se presentan, así como el orden en el que aparecen desde el primer mordisco, pasando por la masticación, hasta la fase residual. Habitualmente, la medida de las magnitudes se realiza, al igual que en el perfil de *flavor*, mediante escalas de categorías o de intervalos (Onega Pagador, 2003).

I.4.2.2. Análisis descriptivo cuantitativo (QDA)

Este método, desarrollado por Stone y col. (1974), permite una descripción bastante completa de las propiedades sensoriales del producto. Se compone de dos etapas: entrenamiento y medición.

Durante la primera etapa el líder de panel presenta muestras para evaluar con el panel y generar descriptores, que son agrupados por atributo, ya que una misma sensación puede ser descrita por más de una palabra se discuten y agrupan las palabras que refieren a igual característica sensorial. Fijados los descriptores, se procede a consensuar las referencias para cada sensación y para las escalas. Luego de probar la homogeneidad de criterio por parte del panel evaluando individualmente, el mismo es competente para realizar el ensayo (Hough, 2009).

Las ventajas del mismo radican en la posibilidad de evaluar a la vez varias características sensoriales y varios productos, empleando un número de evaluadores limitado (entre 8 y 12), los cuales pueden ser monitoreados estadísticamente, los descriptores y referencias utilizados son obtenidos por consenso previo, por lo cual específicos al producto en cuestión, es un método cuantitativo, más allá de que las

escalas a utilizar sean estructuradas o no, con referencias o no; y los resultados pueden evaluarse estadísticamente y representarse gráficamente (Hough, 2009).

I.4.2.3. Escalas sensoriales.

La escala es el instrumento que se utiliza para medir las respuestas sensoriales, y de su correcta elección dependerá el éxito de la evaluación sensorial (Onega Pagador, 2003).

Las escalas de intervalos permiten ordenar muestras, de acuerdo a la magnitud de una característica del producto o de acuerdo a la aceptabilidad o preferencia (Watts, 1992). Son escalas cuantitativas, donde se asume que el intervalo o distancia entre puntos es constante y tienen un punto cero arbitrario (Onega Pagador, 2003).

Las escalas lineales son utilizadas comúnmente como escalas de intervalos para cuantificar características. Pueden ser *estructuradas*, donde se define cada punto que comprende los cambios por lo que puede esperarse que varíe la característica sensorial; o *no estructuradas*, son aquellas en las que se identifican los extremos y en ocasiones el centro, dando plena libertad al juez para indicar dónde radica su juicio (Watts, 1992; Onega Pagador, 2003).

I.4.3. ANÁLISIS DE PERFIL DE TEXTURA INSTRUMENTAL.

Además de la medición sensorial de la textura, es posible medir la textura mediante técnicas instrumentales, que se desarrollaron con el objetivo principal de establecer correlaciones con la percepción de la textura alcanzada mediante análisis sensorial. Las mediciones instrumentales de textura pueden dividirse en 2 categorías: ensayos empíricos y ensayos imitativos. Los primeros se utilizan para medir propiedades físicas de los alimentos (penetrómetros, viscosímetros, compresores), mientras que los segundos tratan de imitar los mecanismos involucrados durante el procesamiento del alimento durante su consumo, como la masticación (Bourne, 1982). Uno de los ensayos imitativos más conocidos es el texturómetro de alimentos y el método se denomina Análisis de Perfil de Textura (APT). El APT imita la acción de masticación de los dientes. La idea principal del método es que aproximadamente un pedazo de alimento, del tamaño de un bocado se comprime/penetra dos veces. Como resultado, se obtiene una curva de fuerza-tiempo. Varias propiedades de textura, como la dureza,

cohesividad, elasticidad y fragilidad, por mencionar algunos, se puede estimar a partir de esta curva (Bourne, 1982).

Esta evaluación se puede realizar mediante la técnica de penetrometría, en la cual una sonda o penetrómetro de geometría dada es conducida en un material en un intervalo de tiempo y la fuerza requerida para una determinada penetración y/o la profundidad de penetración total es medida durante una doble penetración; es decir, se basa en la medida de la resistencia que opone un alimento a que una pieza determinada (sensor) penetre en él. La fuerza máxima necesaria está relacionada con la firmeza del alimento, con geometría y dimensiones del punzón del penetrómetro, la distancia de penetración y la velocidad con que se aplica la fuerza (Zúñiga y col., 2007).

En la tabla I.6. se definen los principales parámetros mecánicos texturales obtenidos a partir de la curva Fuerza (Newton) vs. Tiempo (segundos) (figura I.14.) (Szczesniak, 2002).

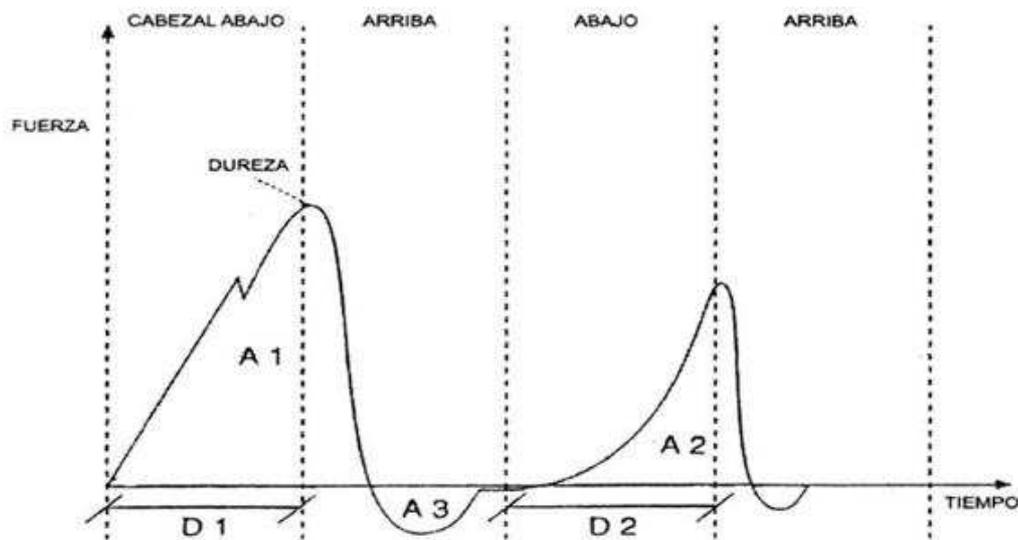


Figura I.14. Curva de Análisis de Perfil de Textura típica obtenida con un Instron. Adhesividad: A3; Elasticidad: D2/D1; Cohesividad: A2/A1. (Fuente: Santini y col., 2007).

Tabla I.6. Definición de las propiedades mecánicas de textura (Fuente: Borda, 2011).

PARÁMETRO	DESCRIPCIÓN FÍSICA	DESCRIPCIÓN GRÁFICA
Dureza	Propiedad relativa a la fuerza requerida para deformar el alimento o para hacer penetrar un objeto (cuchara, cuchillo) en él. En la boca se percibe al comprimir los productos sólidos entre los dientes o los semisólidos entre la lengua y el paladar.	Fuerza máxima ejercida en el primer ciclo.
Cohesividad	Propiedad relativa al grado de deformación de un producto antes de romperse. Sensorialmente relacionada con el grado en que una sustancia es comprimida entre los dientes o dedos antes de romperse. Visualmente se asocia al autosostén de la estructura.	Área 2 / Área 1
Elasticidad	Propiedad relacionada con la rapidez de recuperación de la deformación producida al aplicar una fuerza y el grado de dicha recuperación al eliminarla. Sensorialmente relacionada con el grado en que una sustancia recupera su forma inicial luego de ser comprimida con los dientes o estirada con los dedos.	Distancia 2 / Distancia 1
Adhesividad	Propiedad relativa al esfuerzo requerido para separar la superficie del alimento de otra superficie (lengua, dientes). También relacionada con la pegajosidad.	Área 3
Gomosidad	Propiedad relativa a la cohesión de un producto blando. La sensación bucal está relacionada con el esfuerzo requerido para reducir el producto al estado necesario para su deglución. Deriva de dureza y cohesividad. Asociado a la pastosidad/harinosidad.	Dureza*Cohesividad
Masticabilidad	Propiedad relacionada con la cohesión y con el tiempo necesario o el número de masticaciones requeridas para dejar un producto sólido en condiciones para su deglución. Relacionada con los parámetros de dureza, cohesividad y elasticidad. Asociado a la terneza/fibrosidad.	Dureza*Elasticidad*Cohesividad

I.4.4. SINÉRESIS.

La sinéresis se asocia inversamente con la capacidad de retención de agua de los alimentos, siendo una medida de la cantidad de lactosuero que se desprende del producto y se acumula en la superficie (Tamime y Robinson, 1991). El fenómeno de sinéresis requiere especial atención, ya que la secreción de agua de la estructura del gel puede acabar con la estabilidad de las LF, llegando a constituir uno de los defectos más indeseables en el producto final y que produce una menor aceptación por parte de los consumidores. De ahí que sea un parámetro de interés, pues entre las más importantes características asociadas a la calidad de las LF se encuentra la ausencia completa de suero libre y grumos (Rojas Castro y col., 2007).

La sinéresis espontánea es la contracción del coágulo sin la aplicación de una fuerza externa, y está relacionada con la inestabilidad de la matriz de las LF. El desprendimiento del suero puede prevenirse incrementando el contenido de sólidos totales, utilizando estabilizantes y evitando tratamientos térmicos excesivos de la leche. Durante la fermentación deben evitarse la agitación y las altas temperaturas, siendo positiva para la retención del suero una alta producción de ácido en forma lenta (baja velocidad de acidificación) (Lucey, 2002).

I.4.5. COMPOSICIÓN QUÍMICA.

La composición química de los alimentos es una medida de su potencial valor nutritivo.

Siempre que se realiza una nueva formulación de un alimento, se debe conocer en qué proporción se encuentran los diferentes nutrientes, lo que es fundamental a la hora de cuantificar su contribución a las necesidades de un organismo, ya sea energética o de materia para reparación de tejidos y crecimiento. Además, la composición química normalmente puede definir en parte los caracteres físicos de un alimento y su digestibilidad (Moreno Rojas, 2000).

I.4.6. ACTIVIDAD DE AGUA.

Las propiedades coligativas, reológicas y de textura de un alimento dependen de su contenido de agua, así como las reacciones físicas, químicas, enzimáticas y microbiológicas. Las reacciones disponen del contenido de agua *libre*, mientras que el agua *ligada* está unida a la superficie sólida y no interviene en las mismas por estar *no*

disponible o *inmóvil*. La actividad del agua cuantifica la disponibilidad de agua que es capaz de propiciar estos cambios; valor empírico que permite predecir la estabilidad y la vida útil de un producto (Badui, 2006).

La disponibilidad de agua libre (proporción de agua que está disponible para las actividades metabólicas de los organismos) de un alimento determina su vida útil y puede medirse en la práctica utilizando el concepto de **actividad de agua** (a_w), que se define como *la relación existente, a igual temperatura, entre la presión de vapor de agua sobre la superficie del alimento (p) y la presión de vapor del agua pura (p_o)* (ec. 8) (Spreer, 1991).

$$a_w = p/p_o \quad (\text{ec. 8})$$

La a_w se expresa como un valor entre 0 hasta 1; en donde 1 representa la a_w del agua pura a 0°C, y 0 equivale a la a_w de un alimento totalmente deshidratado (Early, 2000).

La actividad de agua está íntimamente relacionada con las propiedades físicas, químicas y biológicas de los alimentos y juega un papel muy importante en su estabilidad, ya que afecta la tendencia de un alimento a sufrir alteraciones de origen microbiano, enzimático o químico (Bello Gutiérrez, 2000).

I.4.7. pH Y ACIDEZ.

El valor de **pH** de un producto representa *la acidez actual o real del mismo, siendo una medida de la concentración de protones libres*.

En cambio, la **acidez Dornic** *es el contenido aparente en ácidos, esto es la concentración de protones libres y los potenciales a liberarse*. La acidez titulable incluye a la acidez natural de la leche y también a la desarrollada.

La acidez desarrollada es debida al ácido láctico y a otros ácidos procedentes de la degradación microbiana de la lactosa, y eventualmente de los lípidos, en leches en vías de alteración (Alais, 2003).

Aunque la relación entre la acidez titulable y el pH en un sistema tamponado como las LF no es directa, la determinación del pH es sumamente conveniente, ya que se ha establecido una correlación entre el mismo y las características óptimas de cada tipo de yogur, además de ser el parámetro utilizado industrialmente para decidir el fin de la fermentación. No obstante, para controlar la acidez del producto final y ajustarla en

forma precisa a los gustos del consumidor, es aconsejable determinar la acidez titulable (Tamime y Robinson, 1991).

I.4.8. RECUENTO DEL MICROORGANISMO PROBIÓTICO.

Como se discutió anteriormente, en los alimentos probióticos se requiere la viabilidad de las bacterias durante toda su vida útil, a fin de asegurar beneficios para la salud en el consumidor, siendo la cantidad mínima recomendada de bacterias viables de 10^6 UFC.mL⁻¹ (Kristo y col., 2003).

Estudios han demostrado que la viabilidad de microorganismos probióticos depende de la cepa y la interacción con otras cepas utilizadas, así como de factores inherentes al proceso de elaboración, tales como el momento en el cual las bacterias son agregadas y la temperatura de fermentación y a las características del producto, como la composición química, el contenido de sólidos, disponibilidad de nutrientes, oxígeno disuelto, acidez final y temperatura de almacenamiento. El bajo pH de las LF y el fenómeno de postacidificación durante el almacenamiento han sido señalados como los principales factores responsables de la baja viabilidad de probióticos (Vinderola y col., 2010).

Por esta razón, es esencial disponer de un método de cuantificación rápido y confiable de microorganismos probióticos, que se adapte al caso en particular y que permita determinar las concentraciones durante el almacenamiento de manera rutinaria (Vinderola y Reinheimer, 2000).

I.5. DISEÑOS EXPERIMENTALES Y TRATAMIENTOS ESTADÍSTICOS.

El **diseño estadístico de experimentos** es precisamente la forma más eficaz de hacer pruebas. *Consiste en determinar cuáles pruebas se deben realizar y de qué manera, para obtener datos que, al ser analizados estadísticamente, proporcionen evidencias objetivas que permitan responder los interrogantes planteados, y de esa manera clarificar los aspectos inciertos de un proceso, resolver un problema o lograr mejoras* (Gutiérrez Pulido y de la Vara Salazar, 2008).

I.5.1. CONCEPTOS Y DEFINICIONES.

I.5.1.1. Experimento.

Un **experimento** es un cambio en las condiciones de operación de un sistema o proceso, que se hace con el objetivo de medir el efecto del cambio sobre una o varias propiedades del producto o resultado (Gutiérrez Pulido y de la Vara Salazar, 2008). Un experimento generalmente se realiza por alguno de los siguientes motivos:

- determinar las causas de variación en la respuesta;
- comparar las respuestas en diferentes niveles de observación de variables controladas;
- obtener un modelo estadístico-matemático que permita hacer predicciones de respuestas futuras (Montgomery, 1997).

I.5.1.2. Unidad experimental.

La **unidad experimental** es la/s pieza/s o muestra/s que se utiliza para generar un valor que sea representativo del resultado del experimento o prueba (Gutiérrez Pulido y de la Vara Salazar, 2008).

I.5.1.3. Variables, factores y niveles.

Una variable es la característica de un objeto que puede ser observada, medida y analizada para encontrar las respuestas al problema en cuestión.

Un factor es aquella variable de interés cuyo posible efecto sobre la respuesta se quiere estudiar (Montgomery, 1997).

En todo proceso intervienen distintos tipos de variables o factores como los que se muestran en la figura I.15. (Gutiérrez Pulido y de la Vara Salazar, 2008).

✓ **Variable/s de respuesta:** a través de esta/s variable/s se conoce el efecto o los resultados de cada prueba experimental (variables de salida).

✓ **Factores controlables:** son variables de proceso o características de los materiales experimentales que se pueden fijar en un nivel dado. A los factores controlables también se los conoce como variables de entrada, condiciones de proceso, variables de diseño o simplemente factores.

✓ **Factores no controlables o de ruido:** son variables que no se pueden controlar durante la operación normal del proceso (luz, humedad, temperatura ambiente, etc.).

✓ **Factores estudiados:** son las variables que se investigan en el experimento para observar cómo afectan o influyen en la variable respuesta (variables de entrada).

✓ **Niveles y tratamientos:** son los diferentes valores que se asignan a cada factor estudiado en un diseño experimental. Una combinación de niveles de todos los factores se llama tratamiento o punto de diseño

✓ **Error:** el error designa las pequeñas diferencias entre el valor exacto y el observado en cada medición. Se puede considerar los siguientes errores:

- Error aleatorio: es la variabilidad observada que no se puede explicar por los factores estudiados; y resulta del pequeño efecto de los factores no estudiados y del error experimental.

- Error experimental: es un componente del error aleatorio que refleja los errores del experimentador en la planeación y ejecución del experimento (Gutiérrez Pulido y de la Vara Salazar, 2008).

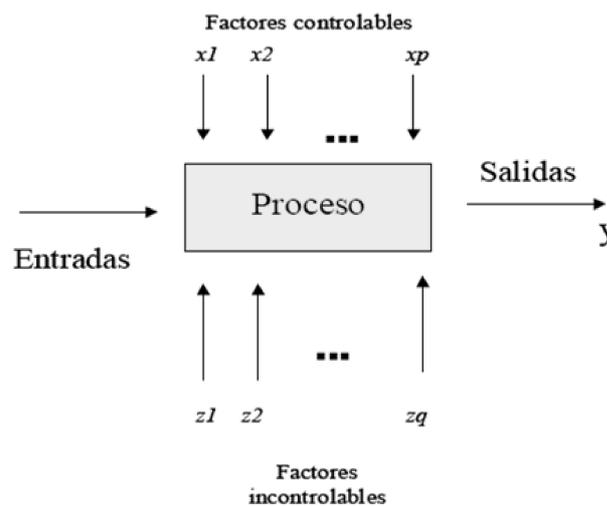


Figura I.15. Modelo general de un proceso o sistema (Fuente: Gutiérrez Pulido y de la Vara Salazar, 2008).

I.5.2. ETAPAS EN EL DISEÑO DE EXPERIMENTOS.

1. Planeación y realización: diseñar un experimento con una estructura lo más adecuada posible a la situación que se desea estudiar y a los medios disponibles.

- a. Entender y delimitar el problema u objeto de estudio.
- b. Seleccionar y definir la/s variable/s respuesta.
- c. Elegir los factores y niveles que han de intervenir en el experimento.
- d. Planear y organizar el trabajo experimental.

- e. Realizar el experimento.
2. Analizar estadísticamente los resultados obtenidos y comprobar si las hipótesis establecidas y el modelo de diseño elegido se adecuan a la situación estudiada.
3. Realizar las modificaciones oportunas para ampliar o modificar el diseño.
4. Obtener las conclusiones apropiadas (Gutiérrez Pulido y de la Vara Salazar, 2008).

I.5.3. DISEÑOS FACTORIALES.

Un **diseño factorial** es un diseño experimental que sirve para estudiar el efecto individual y de interacción de varios factores sobre una o varias respuestas (Gutiérrez Pulido y de la Vara Salazar, 2008).

El **efecto** de un factor se define como el *cambio observado en la variable de respuesta debido a un cambio de nivel de tal factor*. En particular, los efectos principales son los cambios en la media de la variable de respuesta que se deben a la acción individual de cada factor, mientras que, se dice que dos factores interactúan entre sí o tienen un efecto de interacción sobre la variable de respuesta, cuando el efecto de un factor depende del nivel en que se encuentra el otro (Gutiérrez Pulido y de la Vara Salazar, 2008).

I.5.3.1. Tipos de diseños factoriales.

Los diseños factoriales se dividen en dos categorías:

✓ **Diseño factorial completo.** Se utiliza principalmente cuando el número de factores (k) a estudiar está entre dos y cinco ($2 < k < 5$), rango en el cual su tamaño se encuentra entre 4 y 32 tratamientos o experiencias, dependiendo de los niveles de cada factor, cantidad manejable en muchas situaciones o estudios experimentales (Dante y col., 2003).

- **Diseño factorial 2^k .** En estos diseños, cada factor se estudia a sólo dos niveles y sus experimentos contemplan todas las combinaciones de cada nivel de un factor con todos los niveles de los otros factores. Los niveles se suelen denotar con (+1) el nivel mayor y (-1) el nivel menor, en donde k es el número de factores a controlar (Ferré, 2002).

- **Diseño factorial 3^k .** Este es un diseño que consta de tres niveles de cada factor. Los tres niveles de los factores pueden referirse como nivel inferior (-1), intermedio (0)

y superior (+1). La adición de un tercer nivel permite modelar con una relación cuadrática la relación entre cada respuesta y cada factor (Ferré, 2002).

✓ **Diseño factorial fraccionado ($k-p$).** Este permite estudiar un número elevado de factores con un número de experimentos mucho menor que los diseños factoriales completos (Dante y col., 2003).

I.5.4. DISEÑO BOX-BEHNKEN.

Este diseño se aplica cuando se tienen 3 o más factores y suelen ser eficientes en cuanto al número de corridas. Es un diseño rotatable que se distingue porque no incluye como tratamientos a los vértices de la región experimental (Gutiérrez Pulido y de la Vara Salazar, 2008) (figura I.16).

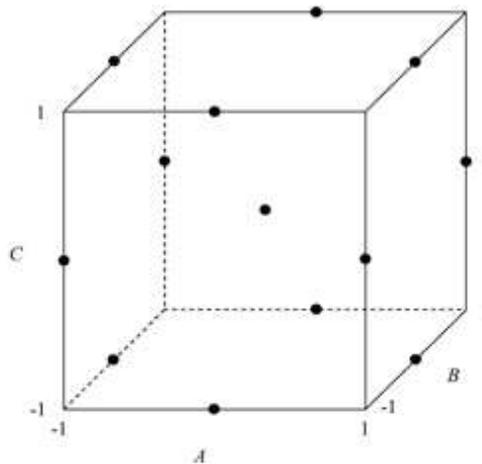


Figura I.16. Representación geométrica de un diseño de Box-Behnken para tres factores (A, B, C).

I.5.5. ANÁLISIS DE VARIANZA Y MODELOS DE REGRESIÓN LINEAL MÚLTIPLE.

El **análisis de varianza** (ANOVA) es una técnica estadística que sirve para analizar la variación total de los resultados experimentales de un diseño en particular, descomponiéndolo en fuentes de variación independientes atribuibles a cada uno de los efectos en que constituye el diseño experimental. Esta técnica tiene como objetivo identificar la importancia de los diferentes factores ó tratamientos en estudio y determinar cómo interactúan entre sí. Es importante resaltar que el ANOVA supone que

la variable de respuesta se distribuye normal, con varianza constante y que las mediciones son independientes entre sí (Gutiérrez Pulido y de la Vara Salazar, 2008).

La **hipótesis estadística** es el supuesto que se hace sobre el valor de un parámetro (constante que caracteriza a una población) el cual puede ser validado mediante una prueba estadística. Generalmente la hipótesis a probar es si los tratamientos tienen el mismo efecto sobre la variable que se estudia (hipótesis nula, H_0) o no (hipótesis alternativa, H_A) (Gutiérrez Pulido y de la Vara Salazar, 2008).

El **análisis de regresión** tiene como objetivo *modelar en forma matemática el comportamiento de una variable de respuesta en función de una o más variables independientes (factores)*. Un modelo de regresión lineal múltiple de segundo orden viene dado por la ecuación 9, donde X_1 , X_2 , son las variables independientes o regresoras, Y es la variable respuesta, β_j son los parámetros del modelo que se conocen como coeficientes de regresión y ε es el error aleatorio (Gutiérrez Pulido y de la Vara Salazar, 2008).

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \varepsilon \quad (\text{ec. 9})$$

La hipótesis global más importante sobre un modelo de regresión múltiple consiste en ver si la regresión es significativa. Esto se logra probando la siguiente hipótesis:

$$H_0: \beta_1 = \beta_2 = \dots \beta_k = 0$$

$$H_A: \beta_j \neq 0 \text{ para al menos un } j = 1, 2, \dots, k$$

Aceptar H_0 significa que ningún término o variable en el modelo tiene una contribución significativa al explicar la variable de respuesta, Y . Mientras que rechazar H_0 implica que por lo menos un término en el modelo contribuye de manera significativa a explicar Y (Gutiérrez Pulido y de la Vara Salazar, 2008).

El que un modelo sea significativo no necesariamente implica que sea bueno en términos de que explique la variación de los datos. Por ello es importante tener mediciones adicionales de la calidad del ajuste del modelo, como las gráficas de residuales y el coeficiente de determinación (R^2). Este coeficiente se interpreta como el porcentaje de variabilidad de los datos que son explicados por el modelo. Además, también se puede utilizar el coeficiente de determinación ajustado (R_{aj}^2) que se prefiere en lugar de R^2 cuando hay muchos términos en el modelo. Se cumple que $0 < R_{aj}^2 \leq R^2 \leq 1$. En general, para fines de predicción se recomienda un R_{aj}^2 de al menos 0,7 (Gutiérrez Pulido y de la Vara Salazar, 2008).

Los buenos modelos son aquellos que cumplen más criterios de calidad del ajuste. Siempre existirán circunstancias en las que, al no cumplirse alguno de los criterios, desde el punto de vista práctico no necesariamente harán inviable el modelo (Gutiérrez Pulido y de la Vara Salazar, 2008).

El uso de software estadístico permite el estudio detallado de las respuestas obtenidas en función de las variables estudiadas. Si se cuenta con un modelo con muchos términos y se quiere tener un modelo depurado que incluya sólo términos significativos (que realmente ayuden a explicar la variable de respuesta), entonces se recomienda aplicar la técnica de selección de variables (Gutiérrez Pulido y de la Vara Salazar, 2008).

Los modelos predictivos son usados para predecir y controlar varios procesos en la industria láctea y/o modelización matemática de los atributos del producto final y configuraciones de procesos. Usando los ajustes de regresión polinomiales, con variables codificadas, permite encontrar modelos matemáticos predictivos y descriptivos de los sistemas estudiados, lo que ayuda en el control de procesos y la influencia de las formulaciones utilizadas (Myers y Montgomery, 1995; Roupas, 2008).

1.5.6. METODOLOGÍA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA.

La **metodología de superficie de respuesta** (MSR) *es la estrategia experimental y de análisis que permite resolver el problema de encontrar las condiciones de operación óptimas de un proceso, es decir, aquellas que dan por resultado “valores óptimos” de una o varias características de calidad del producto* (Gutiérrez Pulido y de la Vara Salazar, 2008).

La MSR implica 3 aspectos: diseño, modelo y técnica de optimización. El diseño y el modelo se piensan al mismo tiempo, y dependen del tipo de comportamiento que se espera en la respuesta. El modelo puede ser de primer o segundo orden (plano o con curvatura, respectivamente) (Gutiérrez Pulido y de la Vara Salazar, 2008).

El aspecto del modelo utiliza el análisis de de regresión lineal múltiple, junto con sus elementos básicos que son: parámetros del modelo, modelo ajustado, significancia del modelo, prueba de falta de ajuste, residuos, predichos, intervalos de confianza para predichos y coeficiente de determinación (Gutiérrez Pulido y de la Vara Salazar, 2008).

Por último el aspecto de optimización está formado por algunas técnicas matemáticas que sirven para que, dado un modelo ajustado, explorarlo a fin de obtener información sobre el punto óptimo (Gutiérrez Pulido y de la Vara Salazar, 2008).

I.6. RELEVANCIA DEL PRODUCTO OBTENIDO Y ESTUDIO REALIZADO.

En la actualidad, el conocimiento generalizado del rol del colesterol alimentario como factor de riesgo de enfermedades cardiovasculares ha influido en la preferencia de los consumidores hacia alimentos saludables, libres o reducidos en colesterol, que además de cubrir las necesidades nutricionales aporten beneficios a su salud. Esta realidad motiva el desarrollo de productos lácteos sin o reducidos en colesterol que, a diferencia de los productos descremados existentes actualmente en el mercado, conservan la grasa láctea, de vital importancia desde el punto de vista organoléptico, nutricional y funcional.

El agregado de bacterias probióticas aumenta la calidad funcional del producto, otorgando beneficios extras a la salud del consumidor, mientras que el aporte de calcio y aminoácidos esenciales a través de proteínas de suero incrementa su valor nutricional. Por otra parte, el uso de un espesante no convencional como la espina corona otorga características particulares a las leches fermentadas, lo que requiere un estudio detallado de su influencia sobre las propiedades físicas, químicas y organolépticas del producto, las cuales se verán afectadas por la matriz alimentaria, en particular por su interacción específica con el almidón de mandioca modificado, la gelatina y las proteínas lácteas. Esto constituye el primer caso de estudio que se describirá más adelante. En base a todo lo expuesto anteriormente, se plantearon dos sistemas de estudio: uno de ellos relacionado al empleo de hidrocoloides nacionales y el otro a la utilización de WPC, LPD y calcio para conocer sus efectos sobre las características reológicas, texturales, sensoriales, microbiológicas y fisicoquímicas de LF probióticas, con colesterol reducido, y su influencia durante el almacenamiento.

Todas estas características particulares aportan un valor agregado al producto obtenido en el presente trabajo, priorizando la calidad y enfocado en satisfacer las demandas actuales de los consumidores.

Por otro lado, la identificación de bacterias aisladas de productos comerciales de origen europeo y otras provenientes de la Colección Scardovi de la Universidad de Bologna, permitió estudiar la posible utilización de sustratos prebióticos y otros aditivos por parte de las mismas como así también ver la viabilidad frente a condiciones gastrointestinales simuladas y en el producto final de las cepas testeadas.

Capítulo II

Objetivos

II.1. OBJETIVO GENERAL.

Obtener y evaluar Leches Fermentadas Probióticas, con colesterol reducido y fortificadas, para consumo de la población en riesgo nutricional y/o cardiovascular, manteniendo el contenido de grasa láctea.

II.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- ✓ Producir leches fermentadas probióticas con colesterol reducido.
- ✓ Estudiar la cinética de acidificación durante la fermentación.
- ✓ Caracterizar la estructura reológica de los sistemas, estableciendo su relación con la estabilidad de los geles obtenidos y la influencia de diferentes hidrocoloides naturales y variables tecnológicas de coagulación.
- ✓ Determinar la composición química de las leches fermentadas obtenidas.
- ✓ Estudiar la estabilidad del coágulo (sinéresis) durante el almacenamiento.
- ✓ Estudiar las variaciones específicas del producto final (fisicoquímicas, reológicas, texturales y sensoriales) durante el almacenamiento o vida útil.
- ✓ Cuantificar la viabilidad del microorganismo probiótico utilizado durante la vida útil de las leches fermentadas.
- ✓ Analizar sensorialmente los productos formulados y sus características texturales.
- ✓ Optimizar formulaciones variando la concentración de gelificantes y espesantes convencionales (gelatina y almidón modificado) y no convencionales (goma espina corona) combinando las características texturales y organolépticas deseadas.
- ✓ Identificar tanto fenotípica como genotípicamente microorganismos probióticos aislados de productos comerciales de origen europeo y otros provenientes de la Colección Scardovi (BUSCOB) de la Universidad de Bologna.
- ✓ Realizar ensayos de fermentación de prebióticos comerciales y aditivos alimentarios como posibles sustratos del metabolismo de cepas de lactobacilos y bifidobacterias.
- ✓ Estudiar la viabilidad a las condiciones del tracto gastrointestinal y susceptibilidad a antibióticos por parte de cultivos puros de los microorganismos de interés y al ser incorporados en la matriz de leches fermentadas.

Capítulo III

Materiales y Métodos

III. 1. SECCIÓN I.

III.1.1. INSUMOS.

III.1.1.1. Materias primas y aditivos.

Para la preparación de leches fermentadas probióticas con colesterol reducido, se utilizó leche en polvo entera (LPE), leche en polvo descremada (LPD), concentrado de proteínas de suero (WPC 35, con 35% de proteínas en base seca) (Milkaut® SRL, Santa Fe, Arg.), goma espina corona (GEC) (Indear SAICYF, Bs. As., Arg.); gelatina (G) 223 grados Bloom (PBLeiner, Santo Tomé, Arg.) y almidón modificado de mandioca (AMM) (Glutal SA, Esperanza, Arg.); azúcar grado A (Ledesma SAAI, Jujuy, Arg.); sorbato de potasio (Santa Fe Ing. S.R.L., Santa Fe, Arg.); saborizante vainilla (Givaudan Argentina S.A., Bs. As., Arg.); β -ciclodextrina (99 % de pureza) (Ferromet S.R.L., Bs. As., Arg.), cloruro de calcio (Lab. Cicarelli S.A., Arg.) y citrato de calcio (Tate & Lyle SA, Bs. As., Arg.).

III.1.1.2. Reactivos químicos.

Para los análisis fisicoquímicos y la determinación de colesterol se utilizaron reactivos químicos de calidad pro-análisis (Lab. Cicarelli S.A., Arg.). Específicamente, para la cuantificación de colesterol se empleó un kit diagnóstico enzimático-colorimétrico (Sociedad de Bioquímicos, Santa Fe, Arg.).

III.1.1.3. Insumos microbiológicos.

Se utilizó un cultivo iniciador/acidificante de yogur YC-180 (Chr-Hansen Argentina SAIC, Bs. As., Arg.), compuesto por las cepas: *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* y *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. Adicionalmente, se empleó la cepa probiótica comercial *L. rhamnosus* SPI (Sacco SRL, Italia).

Para el recuento en placa del microorganismo probiótico se empleó: medio MRS (De Man, Rogosa y Sharpe) (Biokardiagnostics, Francia); bilis bovina (Sigma-Aldrich, EEUU); agar-agar y peptona de caseína (Britania, Bs. As., Arg.).

III.1.2. MÉTODOS.

III.1.2.1. Diseños experimentales.

III.1.2.1.1. *Caso de estudio 1: Efecto del contenido de hidrocoloides sobre las características fisicoquímicas, reológicas, texturales, microbiológicas y sensoriales de leches fermentadas probióticas con colesterol reducido.*

Se empleó la metodología de superficie de respuesta (MSR) usando un diseño de Box-Behnken (3 factores en 3 niveles). Este diseño experimental consiste en 13 experiencias con 1 réplica del punto central. Las corridas experimentales fueron aleatorias para disminuir los efectos de variabilidad inesperada en las respuestas observadas.

Los diseños experimentales son dados en función de variables estandarizadas o codificadas ya que los niveles de las variables independientes pueden variar de una aplicación a otra, por lo tanto, las variables fueron codificadas de acuerdo a la ecuación 10.

$$X_i = (x_i - x_0) / (\Delta x / 2) \quad (\text{ec. 10})$$

donde X_i es valor codificado, x_i es valor real correspondiente, x_0 es el valor real del centro del dominio y $\Delta x/2$ es la mitad del rango de variación de las variables.

Para este caso, las variables a estudiar fueron los hidrocoloides: Gelatina (G), Almidón modificado de mandioca (AMM) y Goma espina corona (GEC), siendo las ecuaciones de codificación de las variables:

$$X_1 = (G - 0,3) / 0,3 \quad (\text{ec. 11})$$

$$X_2 = (AMM - 0,5) / 0,5 \quad (\text{ec. 12})$$

$$X_3 = (GEC - 0,25) / 0,25 \quad (\text{ec. 13})$$

El rango de variación y punto medio de las 3 variables independientes junto con los valores codificados se presentan en la tabla III.1. Para la adopción del dominio

experimental (límite de las 3 variables operativas) se consideraron las especificaciones técnicas hechas en la regulación sobre aditivos alimentarios presente en Código Alimentario Argentino y su elección se basó en los resultados de experiencias preliminares y datos obtenidos a partir de industria.

Tabla III.1. Dominio experimental del diseño de Box-Behnken utilizado para el caso de estudio 1.

Variables	Denominación		Niveles de factor ^a		
	Codificada	No codificada	-1	0	1
Gelatina	X ₁	G	0	0,3	0,6
Almidón modificado de mandioca	X ₂	AMM	0	0,5	1
Goma espina corona	X ₃	GEC	0	0,25	0,5

^a los niveles de factor no codificados están representados en %m/m.

III.1.2.1.2. *Caso de estudio 2: Efecto de las condiciones de coagulación sobre las características fisicoquímicas, reológicas, texturales, microbiológicas y sensoriales de leches fermentadas probióticas con colesterol reducido.*

Se empleó la metodología de superficie de respuesta utilizando un diseño factorial completo 3^k, de dos variables en tres niveles (3²), con una repetición del centro del diseño (10 experiencias en total).

Las variables seleccionadas en este estudio fueron:

X₁: Concentración de calcio (CAL), adicionado como citrato de calcio. Los cálculos del aporte de calcio por parte del citrato de calcio se muestran en el Anexo I.

X₂: Concentración de caseína (CAS), la cual se obtuvo variando la relación de los agregados de leche en polvo descremada/concentrado de proteínas de suero en polvo, con 35% proteínas en base seca (LPD/WPC35). Esta relación mantuvo constante el porcentaje de sólidos agregados a la leche fluida (3%), pero varió la relación en peso entre cada uno (LPD/WPC) en la siguiente forma: 1:10 (0,272% LPD / 2,72% WPC35); 1:1 (1,5% de cada uno); 10:1 (2,72% LPD / 0,272 % WPC35). Los cálculos de los valores de CAS aportados por cada aditivo se muestran en el Anexo I.

Las concentraciones de calcio utilizadas se eligieron tomando como referencia lo planteado en el trabajo realizado por Gurmeet y Kasiviswanathan (2008), en la cual el yogur fue fortificado con diferentes concentraciones de calcio (25, 50, 75 y 100 mg/ 100 mL), y se observó que las concentraciones óptimas de fortificación serían menores a 50 mg / 100 mL, ya que por encima de dicho valor se encontraron defectos sensoriales. A

partir de esto, tomamos dicha concentración como la experiencia central de nuestro estudio.

En el caso de la caseína, se trató de no variar la cantidad de sólidos totales (tomando como referencia experiencias previas (caso de estudio 1) en las cuales se adicionó WPC en una concentración igual al 3%), por lo que se adoptó este criterio para la combinación de LPD/WPC, partiendo de la mitad de cada uno como experiencia central. A partir de esto y de otras investigaciones se pudieron establecer los valores de los extremos (Remeuf y col., 2003; Amatayakul y col., 2006).

Las ecuaciones de codificación de las variables son:

$$X_1 = (CAL - 0,05) / 0,041 \quad (\text{ec. 14})$$

$$X_2 = (CAS - 0,42) / 0,344 \quad (\text{ec. 15})$$

Los porcentajes de CAL y CAS, codificados y no codificados, utilizados para elaborar las LF probióticas, se observan en la tabla III.2.

Tabla III.2. Dominio experimental del diseño factorial utilizado para el caso de estudio 2.

Variables	Denominación		Niveles de factor ^a		
	Codificada	No codificada	-1	0	1
Calcio	X ₁	CAL	0,009	0,05	0,091
Caseína	X ₂	CAS	0,076	0,42	0,764

^a los niveles de factor no codificados están representados en %m/m.

III.1.2.2. Protocolo de elaboración de leches fermentadas probióticas con colesterol reducido.

A partir de leche en polvo entera se reconstituyó leche fluida al 13 % (p/v) de sólidos totales con agua destilada a 50 °C y agitando durante 10 minutos para favorecer la disolución e hidratación de la misma. Posteriormente, esta mezcla se pasteurizó a 75 °C durante 15 segundos y se homogeneizó en condiciones óptimas. Finalizado dicho proceso, se tomó una muestra de la misma (rotulada como “leche con colesterol”) para la posterior determinación de colesterol.

La leche homogeneizada se enfrió y se agregó β-CD (1%), como agente secuestrante del colesterol, acompañando con agitación durante 20 minutos para favorecer la formación del complejo β-CD - colesterol. Luego, se disminuyó la temperatura de la

mezcla y se procedió a centrifugar (MSE, Mistral 4 L), a 1200 rpm durante 20 minutos, obteniéndose en el sobrenadante “leche sin colesterol”. De igual manera, se tomó una muestra de la misma (rotulada como “*leche con colesterol reducido*”) para la posterior determinación de colesterol.

Posteriormente se calentó la leche “con colesterol reducido” hasta 50 °C y se agregaron los ingredientes y aditivos secos (exentos de colesterol), según el diseño adoptado. Para el caso de estudio 1 se adicionó: 10 % m/m sacarosa, 3% m/m WPC 35, 250 ppm sorbato de potasio y los gelificantes/espesantes en estudio (G, AMM y GEC) en proporciones según el diseño. Para el caso de estudio 2 se agregó: sacarosa (10%), hidrocoloides (0,3% G, 0,5% AMM y 0,5% GEC), 250 ppm de sorbato de potasio y se variaron las proporciones de WPC35 y LPD según diseño. El agregado de la mezcla de ingredientes se realizó lentamente, calentando el sistema hasta los 75 °C. Una vez alcanzada esta temperatura, se procedió a agitar durante 20 minutos para favorecer la disolución e hidratación de los mismos y evitar la formación de grumos.

La mezcla final (leche sin colesterol + aditivos) se trató térmicamente (90 °C durante 5 minutos). Finalmente, se enfrió a la temperatura óptima de fermentación (39 ± 1 °C), la cual se mantuvo en un baño termostático (Haake Thermostatic, Alemania) durante toda la etapa fermentativa.

Se adicionó a esta mezcla final cloruro de calcio (250 ppm, para el caso de estudio 1) y citrato de calcio (en proporciones variables, según el diseño 2). Se inocularon los fermentos: *starters* (YC - 180, dosis: 0,005 g/200 mL de leche) y probiótico (Sp1, dosis: 0,03 g/ 200 mL de leche); previamente activados en una cantidad adecuada de leche estéril con colesterol reducido durante una hora a la temperatura de fermentación.

La fermentación se llevó a cabo, tomando muestras para medir pH y acidez titulable, a intervalos de media hora (durante la primer hora y media de la fermentación) y luego cada veinte minutos, hasta alcanzar un pH = 5,0. Finalizada esta etapa, se homogeneizó a baja presión (100 atm) para mejorar las características texturales del producto, se adicionó saborizante de vainilla (0,05% p/p, Givandan S.A., Arg.) y se disminuyó la temperatura rápidamente haciendo circular el producto a través de un serpentín enfriado con agua helada (2 °C), impulsándolo con una bomba de desplazamiento positivo (helicoidal) que le otorga un amasado adecuado, para obtener un aspecto superficial uniforme. El producto se fraccionó en recipientes acordes a los ensayos a realizar y finalmente, se almacenó en heladera para mantener su conservación (temperatura inferior a 5 °C) hasta su posterior utilización durante 1 mes.

En la figura III.1. se muestra un esquema de la tecnología para la producción de leches fermentadas probióticas con colesterol reducido elaboradas en el presente trabajo.

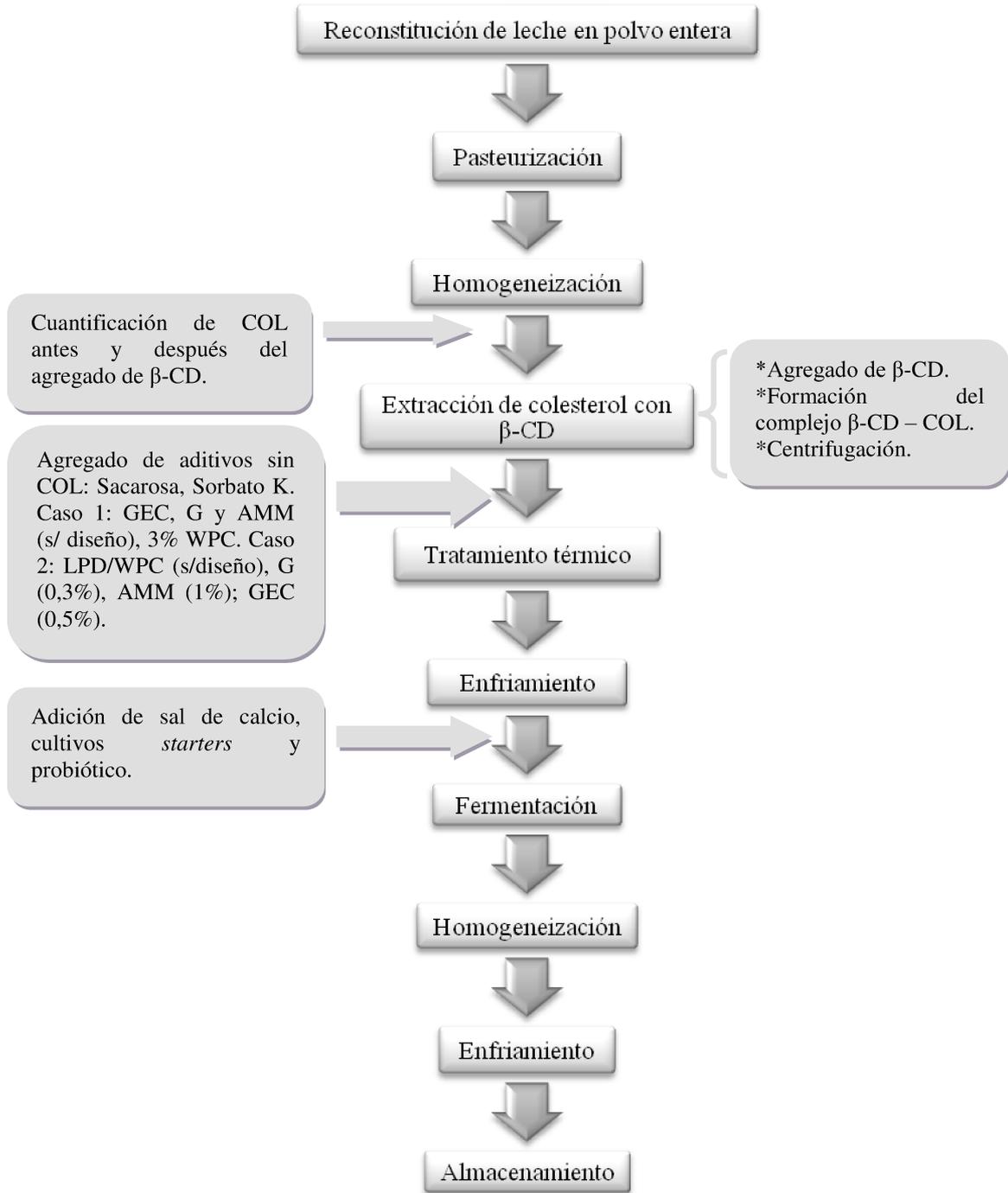


Figura III.1. Etapas del proceso de producción de leches fermentadas con colesterol reducido.

III.1.2.3. Determinación de la concentración de colesterol.

En ambos casos de estudio, para el ensayo de cuantificación de colesterol se utilizaron las muestras rotuladas “*leche sin tratar, con colesterol*” (antes del agregado de β -CD) y “*leche tratada, con colesterol reducido*” (después de la extracción del colesterol con β -CD), trabajándose por cuadruplicado, mediante la aplicación de una técnica enzimática-colorimétrica puesta a punto anteriormente (Soldano, 2009).

III.1.2.3.1. Saponificación.

Se trasvasó a un tubo Falcon de 50 mL, un volumen de 6 mL de cada muestra aleatoria, y se agregó 7,5 mL de una solución de hidróxido de potasio etanólico 2 M. Los tubos se calentaron a 80 ± 1 °C en baño termostático durante 90 minutos. Finalizado el período de incubación, se dejó enfriar a temperatura ambiente.

III.1.2.3.2. Extracción de colesterol.

Sobre cada muestra saponificada se agregó 5 mL de agua destilada y se mezcló en un vórtex (Decalab S.R.L., Arg.) por 20 segundos. Luego se adicionó 5 mL de n-hexano y se agitó nuevamente durante 20 segundos. Posteriormente, se centrifugó en condiciones adecuadas y se extrajeron 3 mL de la fase superior (primera extracción). Las etapas de agregado de n-hexano, agitación y centrifugación se repitieron dos veces, sacando 3 mL de la fase superior en la segunda extracción y 6 mL en la tercera. El volumen total extraído para cada muestra (12 mL) se recolectó en un tubo de vidrio de boca ancha que se colocó, posteriormente, en estufa (Biolec S.A., Arg.) a 45 – 50 °C, evaporando hasta sequedad.

III.1.2.3.3. Cuantificación del colesterol por el método enzimático-colorimétrico.

Cada tubo se terminó de secar bajo corriente de nitrógeno por 5 minutos. El residuo seco se resuspendió en 200 μ L de alcohol isopropílico, y una alícuota de 20 μ L se trasvasó a un tubo de ensayo. Posteriormente, se adicionó 1 mL de reactivo enzimático, preparado en el momento, según instrucciones del fabricante. Por otro lado, se preparó un blanco de reactivos y un testigo (20 μ L de solución de colesterol estándar de concentración 2 mg.mL⁻¹ más 1 mL de reactivo enzimático). Todos los tubos se incubaron simultáneamente en baño termostático a 37 °C durante 15 minutos. Finalmente, se procedió a medir la absorbancia en un espectrofotómetro UV – Visible

(Milton Roy, EE.UU.) a una longitud de onda de 510 nm contra blanco de reactivos. Los resultados se contrastaron con el patrón estándar de colesterol.

III.1.2.3.4. Cálculo de la concentración de colesterol.

La concentración de colesterol (mg%, ec. 18) de las muestras “*leche con colesterol*” y “*leche con colesterol reducido*” se calculó mediante la Ley de Lambert-Beer (Skoog y Leary, 1988) a partir de la absorbancia medida, tal como se muestra en las ecuaciones 16 y 17.

$$A_t = K \cdot C_t \quad (\text{ec. 16})$$

$$A_m = K \cdot C_m \quad (\text{ec. 17})$$

Despejando C_m :

$$C_m = C_t \cdot A_m/A_t \quad (\text{ec. 18})$$

donde,

A_m : absorbancia promedio de la muestra a 510 nm.

A_t : absorbancia promedio del testigo de colesterol a 510 nm.

C_m : concentración de colesterol en la muestra; [C_m] = mg/ml.

C_t : concentración de colesterol testigo; $C_t = 2 \text{ mg/mL}$. $0,02 \text{ mL}/1,02 \text{ mL} = 0,0392 \text{ mg/mL}$.

Teniendo en cuenta las diluciones realizadas, se calculan los mg% de colesterol remanente (ec. 19):

$$\text{mg \% colesterol} = C_m \cdot \frac{V_{m+r}}{V_m \text{ redis.}} \cdot \frac{V_{alc. isop.}}{V_m \text{ inicial}} \cdot \frac{V_{total \text{ hexano}}}{V_{\text{hexano extraído}}} \cdot 100 \quad (\text{ec. 19})$$

donde,

V_{m+r} : volumen de la muestra más volumen del reactivo color (1,02 mL).

$V_m \text{ redis.}$: volumen de la muestra redisuelta (0,02 mL).

$V_{alc. isop.}$: volumen de alcohol isopropílico (0,2 mL).

$V_m \text{ inicial}$: volumen muestra inicial (6 mL).

$V_{total\ hexano}$: volumen total de hexano agregado (15 mL).

$V_{hexano\ extraído}$: volumen total de hexano extraído (12 mL).

Para calcular el porcentaje de extracción de colesterol (% EC) se aplicó la ecuación 20.

$$\% EC = \frac{|C_i - C_f|}{C_i} \cdot 100 \quad (\text{ec. 20})$$

donde,

C_i : concentración de colesterol en la muestra “*leche sin tratar, con colesterol*” (mg%).

C_f : concentración de colesterol en la muestra “*leche tratada, con colesterol reducido*” (mg%).

III.1.2.4. Estudio de las propiedades fisicoquímicas, reológicas, sensoriales, microbiológicas y texturales de las leches fermentadas probióticas con colesterol reducido.

III.1.2.4.1. Estudio de la cinética de acidificación durante la fermentación.

Para ambos casos de estudio, los cambios en el pH durante la fermentación fueron monitoreados continuamente con la ayuda de un pHmetro (Hanna Instruments, Italia) de acuerdo al método de Spinnler y Corrieu (1989). Los parámetros cinéticos: $V_{máx}$ (máxima velocidad de acidificación), $pH_{V_{máx}}$ (pH al cual llega la $V_{máx}$), $t_{V_{máx}}$ (tiempo que tarda en llegar a la $V_{máx}$) fueron calculados a partir de las curvas obtenidas de la ecuación 21 y además se midió el t_{pH5} (tiempo que tarda en llegar al pH = 5, fin de la fermentación),

$$V_{máx} = (dpH/dt)_{máx} \quad (\text{ec. 21})$$

III.1.2.4.2. Determinación de pH y acidez titulable durante la vida útil.

En ambos casos de estudio, se realizó el seguimiento de pH y acidez titulable de cada muestra de yogur a diferentes tiempos de muestreo durante la vida útil, estipulada en un mes: 3, 7, 17, 24, 31 días. Las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado para cada experiencia.

El pH se determinó potenciométricamente, con peachímetro (Herizau modelo 508 A) a la temperatura de conservación (5 °C).

La determinación de la acidez se realizó por titulación directa con NaOH 1/9 N (método Dornic) [920.124] (AOAC, 1995). Una masa determinada de la muestra (10 g aproximadamente) se valoró con una solución de NaOH de concentración conocida, utilizando como indicador fenolftaleína. La expresión de los resultados se realiza en “grados Dornic” (°D) (ec. 22) que luego se refiere a la concentración de ácido láctico (ec. 23).

$$^{\circ}Dornic = \frac{V_g \cdot f_b \cdot f \cdot f_r}{m_m} \quad (\text{ec. 22})$$

$$C_{AL} = ^{\circ}D \cdot \frac{1}{900} \quad (\text{ec. 23})$$

donde,

1 °D = 0,1 g de ácido láctico/ L de muestra.

C_{AL} : concentración de ácido láctico; [C_{AL}] = mol/L; PM_{AL} = 90 g/mol.

V_g : volumen gastado de NaOH N/9 en la titulación; [V_g] = mL.

f_b : factor de valoración del NaOH 1/9 N.

f : factor de conversión = 10.

f_r : factor de referencia = 10.

m_m : masa real de la muestra; [m_m] = g.

III.1.2.4.3. *Determinación de la composición química.*

Para ambos casos de estudio, los ensayos se llevaron a cabo a los 17 días posteriores a la elaboración de las leches fermentadas, considerándose que la composición química permanece constante durante toda la vida útil de las leches fermentadas, según experiencias previas.

III.1.2.4.3.1. *Contenido de grasa.*

El contenido de grasa se determinó mediante el Método Neusal (Farah y Fischer, 2004). Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado para cada experiencia.

En un butirómetro se pesaron 4,7 g de muestra y se agregaron 6 mL de agua destilada a 55 °C. Se cerró con un tapón y se mezcló. Luego, se calentó en baño de agua

a 65 °C hasta disolución completa. Se añadieron 11 mL de solución Neusal, se volvió a tapar el butirómetro y se agitó. Posteriormente, se colocó en baño de agua a 65 °C durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, se centrifugó a 1200 rpm durante 10 min. Nuevamente, se colocó en baño de agua (65 °C – 10 min) y se centrifugó, en las mismas condiciones explicitadas anteriormente. Finalmente, se procedió a la lectura según la marca graduada en el butirómetro y el porcentaje de materia grasa (% MG) se calculó según la ecuación 24.

$$\% MG = \text{lectura butirómetro} \cdot 2 \quad (\text{ec. 24})$$

El Método Neusal fue de elección en este trabajo debido a que el agente químico que se utiliza para la ruptura de la emulsión y separación de la grasa (solución Neusal) no interfiere con los azúcares presentes en las leches fermentadas; a diferencia de lo que ocurre con otros métodos volumétricos como el Método de Gerber, que utiliza ácido sulfúrico y provoca la carbonización de los azúcares, lo que dificulta la correcta lectura en el butirómetro.

III.1.2.4.3.2. Contenido de nitrógeno total y proteína total.

El contenido de nitrógeno total (%NT) se determinó en cada muestra por duplicado, por el método oficial N° 16.036, Kjeldhal (AOAC, 1984).

A partir de la ecuación 25 se calculó el % NT para cada experiencia; que incluye el nitrógeno caseínico, nitrógeno proteico soluble en agua a pH = 4,6 y nitrógeno no proteico.

$$\% NT = \frac{(V_{ac} \cdot N_{ac} \cdot f_{ac} - V_g \cdot N_{ba} \cdot f_{ba}) \cdot f_c \cdot 100}{m_m \cdot 1000} \quad (\text{ec. 25})$$

donde,

N_{ac} : normalidad de la solución de Ácido Sulfúrico (0,1N).

N_{ba} : normalidad de la solución de Hidróxido de Sodio (0,1N).

V_{ac} : volumen de la solución de Ácido Sulfúrico 0,1 N (50 mL).

V_{ba} : volumen gastado de la solución de Hidróxido de Sodio 0,1N (calculado por titulación); [V_{ba}] = mL.

f_{ac}/f_{ba} : factor de la valoración del ácido o la base, respectivamente.

F_c : factor de conversión de meq a mg de Nitrógeno (14 mg/meq).

m_m : masa de la muestra; [m_m] = g.

A partir del valor de % NT, mediante un factor de conversión, se calculó el porcentaje de “proteína total” (% PT), tal como se indica en la ecuación 26.

$$\% PT = \% NT \cdot 6,38 \quad (\text{ec. 26})$$

donde,

6,38: factor de conversión de nitrógeno a proteína de leche.

III.1.2.4.3.3. Contenido de cenizas.

Se determinó según el método oficial N° 16.035 (AOAC, 1984); realizándose por triplicado para cada experiencia.

El porcentaje de cenizas (% CE) se calculó aplicando la ecuación 27.

$$\% CE = \left(\frac{mc_f - mc_i}{m_m} \right) \cdot 100 \quad (\text{ec. 27})$$

donde,

mc_f : masa del crisol conteniendo la muestra luego de la incineración en mufla a 500 °C hasta peso constante (2 horas); [mc_f] = g.

mc_i : masa del crisol vacío; [mc_i] = g.

m_m : masa real de la muestra (masa teórica a pesar: 4 g); [m_m] = g.

III.1.2.4.3.4. Contenido de sólidos totales.

Se determinó mediante el método oficial N° 16.032 (AOAC, 1984), realizándose por triplicado para cada experiencia.

El porcentaje de sólidos totales (% ST) se calculó empleando la ecuación 28.

$$\% ST = \left(\frac{mc_f - mc_i}{m_m} \right) \cdot 100 \quad (\text{ec. 28})$$

donde:

mc_f : masa de la cápsula de porcelana que contiene la muestra luego de desecarse en estufa a 105 ± 1 °C hasta peso constante (4 horas); [mc_f] = g.

mc_i : masa de la cápsula de porcelana vacía; $[mc_i] = g$.

m_m : masa real de la muestra (masa teórica a pesar: 3 g); $[m_m] = g$.

III.1.2.4.3.5. *Contenido de hidratos de carbono.*

El porcentaje de hidratos de carbono (% HC) se calculó por diferencia entre el valor de sólidos totales y la suma de los valores de proteína total, cenizas y grasas; como lo muestra la ecuación 29.

$$\% HC = \% ST - (\% CE + \% MG + \% PT) \quad (\text{ec. 29})$$

III.1.2.4.3.6. *Contenido de humedad.*

La determinación del porcentaje de humedad (% H) de cada muestra se realizó por diferencia, mediante su relación con el porcentaje de sólidos totales, utilizando la ecuación 30.

$$\% H = 100 - \% ST \quad (\text{ec. 30})$$

III.1.2.4.4. *Determinación de la actividad acuosa.*

Para ambos casos de estudio, la determinación de la actividad de agua (a_w) se realizó a temperatura ambiente mediante el empleo del equipo Aqualab RS, a los 17 días posteriores a la elaboración de las leches fermentadas. Para cada muestra se realizaron tres determinaciones.

III.1.2.4.5. *Determinación de la retención de agua.*

Para ambos casos de estudio, el seguimiento de cada muestra del diseño se realizó durante toda la vida útil del producto: 3, 17 y 31 días posteriores a la elaboración de las leches fermentadas. Se llevaron a cabo tres determinaciones por muestra.

III.1.2.4.5.1. *Índice de retención de agua en condiciones aceleradas (por centrifugación).*

Se pesaron aproximadamente 50 g de muestra a 10 °C y se centrifugó durante 20 minutos a 700 ges. Posteriormente, se eliminó el suero liberado y se volvió a pesar. De esta manera, se calculó el índice de retención de agua porcentual por centrifugación

(% IRA) (Amatayakul y col., 2006; Kalab y col., 1976), tal como se indica en la ecuación 31.

$$\% IRA = 100 - \left[\left(\frac{m_1 - m_2}{m_1} \right) \cdot 100 \right] \quad (\text{ec. 31})$$

donde,

m_1 : masa de la muestra antes de la centrifugación; [m] = g.

m_2 : masa de la muestra después de la centrifugación; [m] = g.

III.1.2.4.5.2. Índice de retención de agua en condiciones estáticas (por gravedad).

Se efectuó el mismo procedimiento descrito en el inciso anterior (III.1.2.4.5.1.) exceptuando el paso de centrifugación, y se halló el % IRA_g (ec. 31).

Esta metodología intentó imitar lo que ocurre normalmente con el producto en góndola (Amatayakul y col., 2006).

III.1.2.4.6. Determinación de parámetros reológicos por viscosimetría de cilindros concéntricos.

Para ambos casos de estudio, cada muestra (termostatizada a 10°C) se evaluó para determinar los parámetros reológicos [K , n , A , B , IT], por duplicado, a dos tiempos de ensayo: a los 3 días desde la elaboración (semana 1), y a los 31 días posteriores a la misma (semana 5). Se utilizó un viscosímetro de tubos concéntricos Rotovisco Haake RV2 (HaakeMess - Technik, Alemania), con celdas de 50 y 500 N \times cm (dependiendo de la viscosidad de la muestra) y sistema sensor giratorio MVII.

III.1.2.4.6.1. Determinación del esfuerzo de corte en función del gradiente de deformación.

Se realizaron los reogramas de esfuerzo de corte (τ) en función del gradiente de deformación ($\dot{\gamma}$) variando el gradiente de deformación en forma ascendente primero, desde 0 hasta 200 s⁻¹, y descendente después, desde 200 a 0 s⁻¹. Se aplicaron los modelos reológicos adecuados [*Casson Modificado* (ec. 4) y *Herschel y Bulkley* (ec. 5)], y se estimaron los parámetros reológicos que definen el tipo de flujo del producto: índice de consistencia (K), índice de comportamiento (n). El índice de tixotropía (IT) se

evaluó a partir del área encerrada entre las curvas del reograma τ vs. $\dot{\gamma}$ (figura III.2.), utilizando la ecuación 32.

$$IT = \Delta\dot{\gamma} \cdot \sum(\tau_{sup} - \tau_{inf}) \quad (\text{ec. 32})$$

donde,

IT : área de tixotropía; $[IT] = \text{Pa}\cdot\text{s}^{-1}$.

τ_{sup} : esfuerzo de corte medido sobre la curva superior del reograma, cada 10 s^{-1} .

τ_{inf} : esfuerzo de corte medido sobre la curva inferior del reograma, cada 10 s^{-1} .

$\Delta \dot{\gamma}$: rango de variación adoptado para el cálculo de las áreas de los rectángulos: 10 s^{-1} .

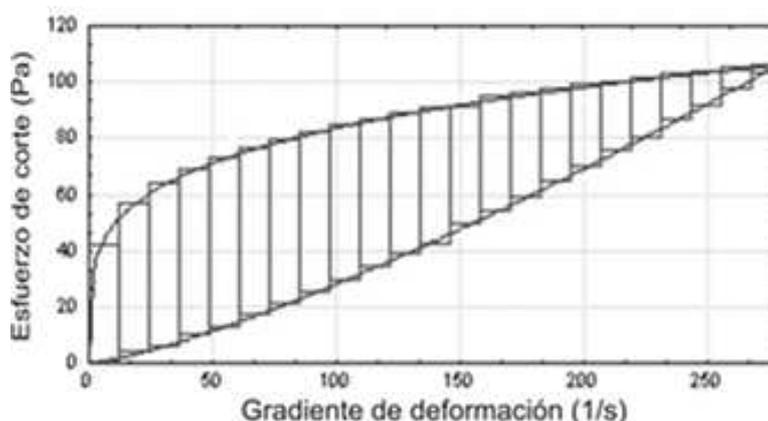


Figura III.2. Reograma τ vs. $\dot{\gamma}$.

III.1.2.4.6.2. *Determinación de esfuerzo de corte en función del tiempo de cizallamiento.*

Con los datos obtenidos de esfuerzo de corte (τ) en función del tiempo de cizallamiento (t), a gradiente de deformación constante ($\dot{\gamma} = 50 \text{ s}^{-1}$, considerado como el gradiente de la masticación normal en la boca para este tipo de productos), y aplicando el *Modelo de Weltmann* (ec. 7) se determinaron los parámetros: resistencia inicial del coágulo (A) y velocidad de ruptura estructural (B).

III.1.2.4.7. *Determinación del perfil de textura por penetrometría.*

Para ambos casos de estudio, se evaluó para cada muestra: la *dureza*, *adhesividad*, *elasticidad*, *cohesividad*, *gomosidad* y *masticabilidad* a partir del perfil de textura obtenido en la gráfica: fuerza (F) vs tiempo (t) (figura I.14, apartado I.4.3).

Para esto se sometió a las muestras a una doble penetración con un penetrómetro Instron Bluehill®, utilizando una proporción 3:1 entre el diámetro del recipiente que

contiene la muestra y diámetro del sensor, con una celda de carga de 10 N. Las muestras se termostataron a 10 ± 1 °C y se sometieron a una velocidad de penetración de un 1 mm.s⁻¹. La distancia de penetración fue de 30 mm. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado a los 3 y 31 días posteriores a la elaboración de las leches fermentadas.

III.1.2.4.8. *Análisis sensorial.*

Para ambos casos de estudio, un panel de evaluadores entrenados analizó los descriptores de textura, *flavor* y defectos encontrados en las muestras obtenidas, codificadas aleatoriamente, y termostatizadas a 10 °C. Los análisis se realizaron a los 3 y 31 días posteriores a la elaboración de las muestras.

III.1.2.4.8.1. *Descriptores de textura.*

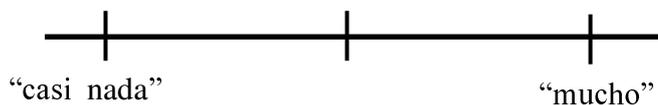
La consistencia se define como el grado de firmeza, densidad o viscosidad de un producto. Se evaluó utilizando la siguiente escala estructurada de 10 cm, anclada en diferentes puntos, donde se marca la intensidad percibida:



donde,

0: fluye como aceite sin dejar orificio, 1: forma un hilo que penetra dejando un orificio que se cierra inmediatamente, 3: forma un hilo y nido, 5: cae en bloque y se hunde rápidamente, 7: cae en bloque y se hunde lentamente, 9: cae en bloque y se hunde de manera intermedia y 10: cae en bloque y no se hunde.

Los términos sensoriales *aspereza* (falta de suavidad, irritante), *astringencia* (sensación resultante de una contracción de la mucosa de la boca) y *cremosidad* (sensación combinada de suavidad y viscosidad del gel, asociada con sensación de recubrimiento de grasa en la boca), se evaluaron utilizando escalas de 10 cm no estructuradas ancladas en los extremos (“casi nada” y “mucho”). Posteriormente, la intensidad de la sensación se transforma en un número: “casi nada” = 1 y “mucho” = 9, para realizar posteriormente el análisis estadístico. Este tipo de escala se esquematiza a continuación:



a contar las colonias, en aquellas placas que contenían entre 30 y 300 colonias, obteniendo las UFC.g⁻¹ (ec. 33) y confirmando luego microscópicamente.

$$\frac{UFC}{g} = \frac{N^{\circ} \text{ de colonias contadas}}{\text{volumen sembrado} \cdot \text{dilución}} \quad (\text{ec. 33})$$

III.1.2.5. Análisis de resultados.

A modo de resumen, la tabla III.3. informa todas las respuestas estudiadas para ambos casos de estudio y los tiempos en los cuales se realizaron los análisis.

Tabla III.3. Respuestas estudiadas para ambos casos de estudio y tiempo en el cual se efectuó el análisis.

✓ Determinación sobre leche reconstituida:							
• Colesterol en leche reconstituida antes y después del tratamiento con β-CD.							
✓ Determinación durante la fermentación:							
• Parámetros cinéticos.							
✓ Determinaciones sobre el producto final:					Tiempo (días)		
			3	7	17	24	31
•	pH y acidez titulable.		X	X	X	X	X
•	Composición química.				X		
•	Actividad de agua (a _w).				X		
•	Retención de agua (IRA) por gravedad y centrifugación.	X			X		X
•	Parámetros reológicos.		X				X
•	Perfil de textura instrumental.		X				X
•	Análisis sensorial.		X				X
•	Análisis microbiológico.		X				X

En los casos que fue posible, se analizó los cambios porcentuales (V%, variación porcentual) en los parámetros durante la vida útil y se expresaron como el porcentaje de la diferencia entre los valores de los parámetros al fin (V_f) e inicio (V_i) de vida útil, dividido por los valores de los parámetros al inicio (ec. 34).

$$V\% = (V_f - V_i) / V_i \times 100 \quad (\text{ec. 34})$$

Los parámetros obtenidos (físicoquímicos, cinéticos, reológicos y sensoriales) se correlacionaron con las variables del diseño, codificadas, a través de regresión múltiple (Design Expert 7.0, Stat-Ease, Inc.), con el objetivo de modelar el comportamiento del sistema y predecir el comportamiento del mismo respecto a dichas variables a partir del

análisis de los coeficientes de los términos de la ecuación polinomial de segundo orden (ec. 35 y 36, correspondientes a los casos de estudio 1 y 2, respectivamente.).

$$R = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \varepsilon \quad (\text{ec. 35})$$

donde, X_1 = variable codificada para Gelatina, X_2 = variable codificada para Almidón modificado de mandioca, X_3 = variable codificada para Goma espina corona,

$$R = \beta_0 + \beta_1 \cdot X_1 + \beta_2 \cdot X_2 + \beta_{11} \cdot X_1^2 + \beta_{22} \cdot X_2^2 + \beta_{12} \cdot X_1 \cdot X_2 + \varepsilon \quad (\text{ec. 36})$$

donde, X_1 = variable codificada para Calcio; X_2 = variable codificada para Caseína (relación LPD/WPC),

y para ambas ecuaciones: R : descriptor o parámetro analizado (respuesta), β_i : coeficientes de cada término, ε : error del modelo.

Junto a cada modelo se informaron los siguientes parámetros estadísticos: R^2 (coeficiente de determinación), R^2 -ajustado, valor F de significancia del modelo, y valor-p para la prueba de falta de ajuste. Cabe aclarar, que en todos los casos, se comprobó la idoneidad del modelo elegido, con los tests de diagnósticos basados en los residuos, para comprobar la homogeneidad de variancias, independencia de los errores y normalidad de los errores.

Se aceptó como modelo aquella expresión matemática obtenida por regresión múltiple con un R^2 y R^2 -ajustado $> 0,7$ y $p < 0,100$.

Se usó la metodología de superficie de respuesta y de líneas de contorno, para analizar y visualizar rápidamente la variación de cada descriptor o parámetro estudiado en función de las dos variables de diseño para cada caso de estudio.

III.2. SECCIÓN II.

Cabe aclarar, que esta sección, si bien no estaba contemplada inicialmente dentro de los objetivos propuestos de la presente tesis, se decidió agregar en el contenido de la misma gracias a los resultados obtenidos durante una estadía de 8 meses (Beca Erasmus Mundus) en la Universidad de Bologna (Italia) y comprende estudios preliminares sobre cepas de lactobacilos y bifidobacterias presentes en productos comercializados del mercado europeo, cepas ya utilizadas en el desarrollo del presente trabajo (casos de estudio 1 y 2) y otras provenientes de la Colección Scardovi (BUSCOB) del Laboratorio de Ciencia y Tecnología Agroambiental de la Facultad de Agronomía de la mencionada Universidad.

III.2.1. AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LACTOBACILOS Y BIFIDOBACTERIAS.

Un total de 16 cepas de lactobacilos y bifidobacterias fueron analizadas: 7 de las cuales provenían de la Colección Scardovi de la Universidad de Bologna, otras 5 fueron aisladas de productos comerciales (leches fermentadas) presentes en el mercado europeo y las últimas 4 fueron provistas por Sacco y Christian Hansen.

III.2.1.1. Aislamiento de cepas probióticas a partir de productos lácteos comerciales.

Se realizó una selección de productos lácteos comerciales adicionados con microorganismos probióticos de mayor interés actual. Se aislaron, para su posterior identificación y caracterización, utilizando diferentes medios selectivos específicos para cada microorganismo en cuestión. Las leches fermentadas compradas (con sus correspondientes cepas declaradas) fueron: ACTIVIA (*B. animalis* ssp. *lactis* DN-173 010), MILA (*B. animalis* ssp. *lactis* BB12), PROVITAL (*L. acidophilus* y *L. casei*), YOMO RINFORZO (*L. rhamnosus*) y KYR (*L. paracasei*).

III.2.1.1.1. Medios y condiciones de cultivo selectivas.

Para bifidobacterias se utilizó medio TPY (Tryptone, Peptone, Yeast) agar (Scardovi, 1986; Modesto y col.; 2003), adicionado con mupirocina (100 mg.L⁻¹). La solución de mupirocina esterilizada por filtración se adicionó al TPY previamente esterilizado en autoclave y luego atemperado a 45-50°C, para evitar el maltrato térmico

y desnaturalización de la misma. Las placas se inocularon en profundidad y se incubaron en condiciones anaeróbicas generadas mediante el uso de Anaerocult A (Merck, Alemania) a 37 °C durante 72 hs. (Corry y col., 2011).

Para lactobacilos se utilizó MRS (DeMan-Rogosa Sharpe) agar (Merck, Alemania) adicionado con sales biliares al 0.15%. La solución de sales biliares esterilizada por filtración se adicionó al MRS previamente esterilizado en autoclave, atemperado a 50°C, para evitar la desnaturalización de las mismas. Las placas se inocularon en superficie y se incubaron por duplicado tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas, a 37°C, durante 48 hs (Vinderola y Reinheimer, 2000).

Específicamente, para *L. rhamnosus*, se utilizó MRS agar adicionado con 1 mg.L⁻¹ de vancomicina. Se incubaron en condiciones anaeróbicas a 37°C durante 72 hs. (Vinderola y Reinheimer, 2000; Tharmaraj y Shah, 2003; Lee y Lee, 2008).

Para el caso de *L. acidophilus* y *L. paracasei* el medio fue MRS-pH modificado (5,4) en anaerobiosis.

Luego de la incubación, se procedió a realizar el recuento de colonias (UFC.mL⁻¹) y algunas de las colonias fueron chequeadas fenotípicamente al microscopio óptico.

La preparación de soluciones y medios de cultivo se indican en el Anexo II.

III.2.1.1.2. Toma de muestra, dilución e inoculación.

Se tomó 1 gr de muestra con espátula estéril y en condiciones asépticas, se diluyó en 99 mL de solución fisiológica (NaCl 0.9%), obteniéndose la dilución 1.10⁻², se vortereó y se continuó la dilución decimal seriada (1 mL en 9 mL). Se inocularon las diluciones desde 1.10⁻⁴ hasta 1.10⁻⁸ aproximadamente, sobre placas agarizadas, en superficie (MRS) o en profundidad (TPY) según la técnica correspondiente.

III.2.1.2. Revitalización de cepas de colección.

Las cepas liofilizadas se inocularon en caldo de MRS ó TPY estéril, se incubaron durante 48 hs a 37°C en anaerobiosis. Se evaluó la morfología de las colonias y sus características por observación microscópica; y se inocularon en MRS o TPY agar, se incubaron nuevamente, durante 48 hs a 37°C en anaerobiosis. De estas placas se obtuvieron las colonias a ser inoculadas individualmente en caldo para la obtención de los cultivos puros concentrados para congelar.

III.2.1.3. Identificación fenotípica.

Se seleccionaron de las placas aquellas colonias con características morfológicas macroscópicas y microscópicas distintivas, a partir de la observación macro y microscópica del cultivo fresco, y la realización de microscopía óptica con aceite de inmersión.

III.2.1.4. Obtención de cultivos puros concentrados.

Se tomó una colonia característica de la placa (chequeada anteriormente al microscopio), se inoculó en 10 mL de soft agar (0,7%) de TPY o MRS (según corresponda) y se incubó 24 hs a 37°C en anaerobiosis. A partir de esta última, se realizó nuevamente la observación microscópica y luego se inoculó en caldo de TPY o MRS, respectivamente y se incubó 24 hs a 37°C en anaerobiosis. Luego se centrifugó a 6000 rpm durante 15 min y el precipitado se resuspendió en 1.5 mL de leche descremada, se conservó a -20°C.

III.2.1.5. Identificación molecular o genotípica.

Se procedió a la identificación molecular genotípica mediante la aplicación de técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) especie-específica a partir del gen 16S rDNA, secuencias repetidas en enterobacterias por PCR (ERIC-PCR) y/o secuenciación parcial de ácido desoxirribonucleico (ADN), según la conveniencia en el caso respectivo. El acondicionamiento de las muestras para lograr su identificación genotípica requirió de varias etapas que se detallan en orden a continuación.

III.2.1.5.1. Extracción de ADN.

A partir de cultivos puros congelados obtenidos de colonias previamente seleccionadas, las cepas fueron cultivadas en caldo de MRS o TPY según se trató de lactobacilos o bifidobacterias, respectivamente, en condiciones anaerobias, a 37 °C. Después de 18-24 horas (dependiendo de la especie), las cepas fueron inoculadas en placas conteniendo un medio de cultivo agarizado conveniente, y se incubaron en condiciones anaeróbicas a 37°C. Las colonias formadas sobre el medio fueron observadas micro y macroscópicamente, luego fueron tomadas mediante la utilización de ansa estéril y utilizadas según las diferentes técnicas posibles a emplear.

- A partir de una colonia: se tomó una colonia y se suspendió en 50 μL de solución TrisEDTA (TE); obtenida a partir de 10 mM de trishidroximetilaminometano con pH ajustado con ácido clorhídrico (Tris-HCl) y 1mM de EDTA pH 8. La extracción del ADN se llevó a cabo por la metodología de Matsuki y col. (2003). La suspensión bacteriana se calentó a 95°C durante 10 min, y luego 2 μL de éste sobrenadante fueron sometidos a PCR. Todas las muestras suspendidas en TE fueron almacenadas a -20 °C para su conservación y uso posterior.
- A partir de cultivo en caldo: Se utilizó el kit comercial Wizard Genomics DNA purification (PROMEGA, USA) para bacterias gram positivas. El Protocolo de extracción se indica a continuación.
 1. Se centrifugó 10 mL de medio de cultivo líquido del microorganismo (24 horas) a 6000 rpm por 20 minutos. Se eliminó el sobrenadante.
 2. Se resuspendió en 480 μL de 50 mM EDTA y se transfirió a un eppendorf de 2 mL. Se mezcló muy bien y vortereó.
 3. Se adicionó 300 μL de lisozima (15-18 mg/mL) e incubó a 37°C por 90 min: esta operación sirve para romper la pared celular.
 4. Posteriormente se centrifugó a 18000 rpm por 2 min y eliminó el sobrenadante.
 5. Se adicionó al pellet 600 μL de Nuclei Lysis Solution (solución a base de guanidina hidrocloreuro) y se pipeteó para resuspender las células: con este paso la célula se rompe.
 6. Se incubó a 80°C por 16 min. Luego se enfrió a temperatura ambiente y vortereó.
 7. Se adicionó 3 μL de RNase solution al lisado, se invirtió el tubo 2 a 5 veces: con este paso se degrada el RNA.
 8. Se incubó a 37°C por 40 min – y se dejó enfriar a temperatura ambiente.
 9. Se adicionó 200 μL de protein precipitate solution al lisado – se vortereó a la velocidad máxima por 20 segundos: con este paso se obtiene la precipitación de la proteína.
 10. Se incubó en hielo por 5 minutos.
 11. Se centrifugó a 18000 rpm por 4 minutos.
 12. Se transfirió el sobrenadante, que contiene el DNA, a un nuevo tubo de 2 mL y luego se adicionó 600 μL de isopropanol a T ambiente: este paso sirve para la precipitación del DNA.

13. Se mezcló invirtiendo la probeta, se formó una especie de “nube” (DNA).
14. Se centrifugó a 18000 rpm por 4 min.
15. Se eliminó el sobrenadante: el pellet que se obtiene es el DNA de interés.
16. Se adicionó 600 μL de EtOH 70% y se mezcló invirtiendo varias veces para lavar el DNA.
17. Se centrifugó a 18000 rpm por 4 min, se aspiró lentamente teniendo cuidado de no arrastrar el pellet (DNA).
18. Se evaporó todo el EtOH esperando al menos 20 minutos.
19. Se adicionó 100 μL de DNA rehydrate Solution (TE) al tubo y se rehidrató de esta manera el DNA incubándolo 1 hora a 65°C y luego overnight a 4°C.
20. Se conservó a -20C.

Para cuantificar el DNA se midió la densidad óptica (DO) a 260 nm de los DNA controles y obtenidos por extracción utilizando un Espectrofotómetro UV/Vis Beckman Coulter DU730, con cubeta de cuarzo.

III.2.1.5.2. *PCR especie-específica y electroforesis en geles de agarosa.*

Para someter una muestra de ADN a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) especie-específica, previamente se preparó una solución maestra (master mix) conformada por la mezcla de 2.5 μL de solución Buffer; 2.5 μL de solución de cloruro de magnesio (MgCl_2); 0.2 μL de deoxinucleósido trifosfato (dNTP); 0.3 μL del primer F (forward) y 0.3 μL del primer R (reverse) correspondientes a la especie específica; 0.125 μL de albúmina sérica bovina (BSA); 0.2 μL de Taq ADN polimerasa (Taq) y 16.875 μL de agua estéril libre de nucleasa esterilizada.

Sobre esta mezcla, se adicionaron 2 μL del ADN (en dilución apropiada con TE para obtener una concentración de 30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) correspondiente a la muestra en estudio o al DNA control, conformando un total de 25 μL , los cuales fueron expuestos al ciclo de amplificación, llevado a cabo en el equipo termociclador de ADN (Biometra, Göttingen, Alemania), el ciclo de amplificación operó en cada caso de acuerdo a las condiciones óptimas para cada caso. También se realizaron controles negativos en ausencia de DNA.

El producto obtenido por PCR fue sembrado en un gel de agarosa al 2% (en TBE) conjuntamente con los DNA controles, y marcadores de peso molecular. La corrida electroforética se realizó entre 150-200 Volts y posteriormente se realizó una tinción en Bromuro de Etidio durante 25 min. Se lavó el gel y se procedió a visualizar las bandas en UV. La preparación de los reactivos así como las condiciones de las corridas electroforéticas se describen en el Anexo II.

Las imágenes de los geles de agarosa fueron obtenidas mediante la cámara digital CoolPix 5400 (Nikon Corporation, Japón) equipada con filtros especiales para bromuro de etidio y una cubierta compacta (MicroBiotech, Italia). Las imágenes fueron normalizadas con Nikon Editor Software 6.2.

III.2.1.1.3.3. ERIC-PCR.

Se realizó además la identificación de algunas bifidobacterias y lactobacilos mediante ERIC-PCR.

Para ello se utilizó el programa ERIC PLUS. Sobre 10 mL de solución mezcla maestra MIX 10X 3.5 mM (conteniendo Taq HOT START PLUS, 200 μg de dNTP y Solución buffer Taq 1X), 1.2 μL de solución de MgCl_2 1.5 mM, 2 μL de Coral Load y 2,8 μL de agua estéril libre de nucleasa; además de 1 μL de cada uno de los primers ERIC 1 y ERIC 2, primeramente diluidos desde 100 $\text{pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ (concentración comercial) a 20 $\text{pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$; se adicionaron 2 μL de muestra de ADN a concentración 30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Se realizaron controles negativos, en ausencia de ADN.

La preparación de los geles para estas lecturas se realizó con 2% de agarosa. Se trabajó a 120 volts para un gel tamaño mediano (120 mL) y 160 volts el gel tamaño grande (180 mL), el tamaño requerido para los pocillos es mayor que para los geles utilizados en PCR, debido a que en éste caso se colocan 20 μL de muestra, se utilizan 6 μL de marcador GeneRuler 1 kb DNA Ladder Plus, listo para usar, 0.1 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 50 μg , Fermentas.

III.2.2. EVALUACIÓN DEL CONSUMO DE COMPUESTOS PREBIÓTICOS Y ADITIVOS ESPESANTES POR PARTE DE LOS MICROORGANISMOS TESTEADOS.

Se probó la capacidad de las cepas aisladas de productos comerciales, las provenientes de la colección Scardovi y aquellas que componen el fermento utilizado en

la elaboración de las leches fermentadas del presente trabajo, de utilizar durante su metabolismo aditivos alimentarios comúnmente utilizados en industria alimentaria, como gelatina de origen bovino y almidón de mandioca modificado, y otros con gran potencial de aplicación, como la goma espina corona, presentes en las leches fermentadas formuladas. El mismo estudio se realizó reemplazando los aditivos por sustancias catalogadas como prebióticas sobre cada una de las cepas, para así comparar y seleccionar él o los mejores conjuntos (sustrato+cepa) que podrían ser utilizados en la formulación de un producto simbiótico.

III.2.2.1. Obtención de los cultivos.

A partir de los cultivos puros congelados de las cepas a ensayar se reactivaron las mismas en caldo MRS o TPY, según sean lactobacilos o bifidobacterias, respectivamente. Posteriormente, se pasaron a caldo MRS o TPY modificado. En ambas etapas se incubaron en anaerobiosis a 37°C durante 24 hs.

Los caldos MRS y TPY modificado: contienen el 50% de las concentraciones usuales de los sustratos potencialmente consumidos por los microorganismos para su crecimiento y desarrollo (Tablas III.4. y III.5.). De esta manera, al adicionar el sustrato en estudio, se ve la capacidad del microorganismo de utilizarlo o no (Crociani y col., 1994).

Tabla III.4. Composición medio MRS modificado.

Componentes	Concentración (g.L ⁻¹)
Proteosa peptona	5
Extracto de carne bovina	5
Extracto de levadura	2,5
Tween 80	1
Citrato de amonio	2
Acetato de sodio	5
Sulfato de magnesio	0,1
Sulfato de manganeso	0,05
Fosfato dipotásico	2

Tabla III.5. Composición medio TPY modificado.

Componentes	Concentración (g.L ⁻¹)
Triptona	5
Peptona	2,5
Extracto de levadura	1,25
Fosfato dipotásico	1,5
Cloruro de magnesio hexahidratado	0,5
Cisteína-HCl	0,5
Tween 80	0,5

III.2.2.2. Ensayo de fermentación.

Se prepararon probetas estériles de 5 mL de MRS o TPY modificado sólo (control negativo), con 1% de glucosa (control positivo), con 1% de las sustancias prebióticas o con 0.5% de los aditivos a evaluar respectivamente. En todos los casos se adicionó indicador púrpura de bromocresol en concentración 30 mg.L^{-1} .

Las sustancias prebióticas evaluadas fueron GOS (galactooligosacáridos Giulio Gross, Italia); FOS (fructooligosacárido extraído de remolacha azucarera Actilight); Inulina Beneo HIS (Orafti); Inulina Raftilina HP (Orafti). Los aditivos fueron gelatina de origen bovino (PB Leiner, Argentina); Almidón modificado de mandioca (Glutal S.A., Argentina) y Goma Espina Corona (NatureGum, Argentina).

Se tinalizaron los caldos en autoclave a espita abierta (100°C) durante 30 min, se dejaron reposar durante 24 horas y se repitió la operación.

En el caso de la goma espina corona se utilizó el equipo ULTRATURRAX T25 a 20500 rpm durante 10 min seguido de 24000 rpm por 3 min, para favorecer su dispersión e hidratación.

Se inoculó al 1% cada microorganismo, a partir de un cultivo con densidad óptica ajustada a $\text{DO}=0,6$ a una longitud de onda de 620 nm. Se incubaron en anaerobiosis, a 37°C , durante 5 días.

El crecimiento bacteriano se estimó por medio de las variaciones de pH, evidenciadas por observación del cambio de color del indicador púrpura de bromocresol presente en el medio, de púrpura ($\text{pH} = 7/6,9$) a amarillo ($\text{pH} = 5,2$), en diferentes momentos (0, 1, 2 y 5 días), además, el pH se determinó potenciométricamente a los 0, 2 y 5 días.

III.2.3. ENSAYO DE RESISTENCIA A LAS CONDICIONES GASTROINTESTINALES SIMULADAS DE LOS CULTIVOS PUROS.

El ensayo de supervivencia a las condiciones del tracto gastrointestinal (bajo pH y presencia de sales biliares) fue llevado a cabo sobre 8 cepas seleccionadas a partir de su utilidad, conveniencia y novedad: *Lactobacillus acidophilus* Barilla (M384); *L. acidophilus* La5 (M403); *L. rhamnosus* Sp1 (M406); *L. rhamnosus* (M405, aislado de Yomo); *B. animalis* ssp. *lactis* MB29; *B. animalis* ssp. *lactis* (M426, aislada de Mila); *B. longum* ssp. *longum* B1835 y *B. longum* ssp. *longum* ATCC 15707^T (RE 11).

III.2.3.1. Preparación de cultivos.

Un cultivo madre congelado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ se inoculó en 10 mL de caldo MRS (para lactobacilos) o TPY (para bifidobacterias) y se incubó durante 18-24 horas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ en condiciones anaeróbicas. Luego de un segundo subcultivo en las mismas condiciones se ajustó una concentración final de aproximadamente $10^9\text{ UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$, con solución salina y controlando por DO. Se tomó 5 mL de este caldo de cultivo, se centrifugó a 6000 rpm durante 15 min a 20°C y el precipitado obtenido se resuspendió en 5 mL de solución salina de fosfato tampón (PBS, Oxoid, Inglaterra) (pH 7,2). De esta solución, 0,2 mL y 1 mL de cultivo fueron retirados para la determinación de los recuentos viables ajustando la DO = 0.9 para lactobacilos y DO = 1 para bifidobacterias, a 620 nm, de modo de obtener concentraciones próximas a $10^9\text{ UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Huang y col., 2007). La suspensión de cultivo restante se centrifugó y se resuspendió en 3,8 mL de solución de PBS con características acorde al ensayo a realizar (de acuerdo si se evalúa la resistencia al pH o a la bilis).

III.2.3.2. Resistencia a bajo pH (2,5) + pepsina.

Se conoce que el tiempo transcurrido desde la entrada de los alimentos al estómago humano hasta su liberación es de aproximadamente 90 min, por lo tanto éste es el tiempo que las cepas probióticas seleccionadas a ser utilizadas en alimentos deben tolerar el ambiente ácido (Santini, 2009).

La tolerancia de tránsito en el estómago se evaluó resuspendiendo las células bacterianas a concentración $10^9\text{ UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$, en 3,8 mL de solución de PBS, con un pH final de 2.5, ajustado con HCl 2 M y adicionada con $3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de enzima pepsina (Sigma-Aldrich), e incubando en condiciones anaerobias a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se realizó el recuento a los 0, 15 y 90 min (Huang y col., 2007; Santini, 2009).

En placas de MRS o TPY agar, se inocularon en superficie las diferentes diluciones obtenidas mediante la técnica de microgotas, la cual consistió en mezclar enérgicamente el cultivo, tomar $100\text{ }\mu\text{L}$ y colocarlos en $900\text{ }\mu\text{L}$ de solución salina, realizar las diluciones seriadas e inocular 3 gotas de $10\text{ }\mu\text{L}$ en cada cuadrante, de una placa dividida previamente en 4 sectores. A tiempo 0 min se inocularon las diluciones desde 10^{-6} a 10^{-9} , a los 15 min se inocularon las diluciones desde 10^{-2} a 10^{-9} y a los 90 min desde 10^{-1} a 10^{-7} y la muestra tal cual (sin diluir). Se incubaron 24-48 horas a 37°C en anaerobiosis y se realizaron los recuentos correspondientes. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

III.2.3.3. Resistencia a la bilis (2%).

En los seres humanos, después de una comida, la concentración de sales biliares aumenta bruscamente en el duodeno hasta aproximadamente 15 mmol/L y luego disminuye progresivamente a 5 mmol/L. En el yeyuno, la concentración de sales biliares es de aproximadamente 10 mmol/L, y en el íleon, la concentración cae por debajo de 4 mmol/L (Santini, 2009). En base a esto, la tolerancia a la bilis se probó resuspendiendo las células bacterianas a concentración 10^9 UFC.mL⁻¹, en 3,8 mL de solución de PBS a pH final igual a 8, ajustado con NaOH 1 M, adicionado al 2% m/v con sales biliares (Ox-Bile LP0055, Oxoid). Se incubó en anaerobiosis a 37°C y se determinó el recuento a diferentes tiempos; 0, 60 y 210 minutos.

En placas de MRS o TPY agar, se inocularon en superficie, mediante la técnica de microgotas (10 µL), las diferentes diluciones. A tiempo 0 min se inocularon las diluciones desde 10^{-6} a 10^{-9} , a los 60 min se inocularon las diluciones desde 10^{-5} a 10^{-8} y a los 210 min desde 10^{-4} a 10^{-7} y la muestra tal cual (sin diluir). Se incubaron 24-48 horas a 37°C en anaerobiosis y se realizaron los recuentos correspondientes. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

Las diferentes soluciones de HCl 2 M, NaOH 1 M, Bilis 10% m/v y pepsina 1 g.mL⁻¹ se prepararon a partir de agua ultrapura y se esterilizaron por filtración (0.22 µm) antes de ser utilizadas.

III.2.4. ENSAYO DE SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS.

Se evaluó mediante el cultivo de las cepas bacterianas en presencia de diferentes concentraciones de varios antibióticos. Los antibióticos utilizados fueron: Tetraciclina (TET), Cefuroxima (CEF), Kanamicina (KAN), Cloranfenicol (CLO), Vancomicina (VAN), Ampicilina (AMP), Estreptomicina (EST) (St. Louis, USA) y Eritromicina (ERI) (Fluka, Suiza).

Todas las soluciones de antibióticos se diluyeron en agua destilada o agua con etanol (dependiendo la solubilidad) para preparar las soluciones madres (10000 µg.mL⁻¹ y 1000 µg.mL⁻¹); y luego se diluyeron adicionalmente con agua ultrapura estéril hasta una concentración final de 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 y 256 µg.mL⁻¹ para el ensayo de resistencia a los antibióticos. Todas las soluciones madres se esterilizaron por microfiltración con filtro antes de su utilización.

Las cepas testeadas fueron las mismas que las utilizadas para ver la resistencia a condiciones gastrointestinales simuladas.

III.2.4.1. Preparación de los cultivos.

Se realizó un cultivo bacteriano de las cepas de lactobacilos y bifidobacterias ensayadas, incubando en caldo MRS o TPY (según correspondiese) en anaerobiosis a 37°C durante 18 hs, luego se realizó un subcultivo en idénticas condiciones, a partir de éste, diluyendo 1 mL en 9 mL de caldo MRS o TPY frescos y finalmente se ajustaron las concentraciones a 10^6 UFC.mL⁻¹ por control de DO a 620 nm, utilizando estándares de McFarland.

III.2.4.2. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM).

Se realizaron las pruebas en microplacas de 96 pocillos cada una, en los cuales se adicionaron 20 µL de antibiótico a la dilución correspondiente, 160 µL de caldo MRS o TPY y 20 µL de cultivo de la cepa correspondiente (10^6 UFC.mL⁻¹).

Se utilizaron diversos controles negativos, compuestos por 1) caldo puro, 2) microorganismo y agua (uno por cepa), 3) agua, caldo y antibiótico en la dilución correspondiente (uno por antibiótico y por dilución).

Las placas se incubaron durante 24 horas en condiciones anaerobias a 37 °C. Se realizó la lectura de DO a 620 nm a tiempo 0 antes de incubar, y a las 24 horas.

A partir de estas lecturas y mediante la implementación de la guía técnica de criterios para la determinación de resistencia antibiótica de la European Food Safety Authority (EFSA, 2008), se determinó la concentración mínima inhibitoria (CIM), que se define como la concentración más baja de antibiótico que da una inhibición completa del crecimiento visible en comparación con un control libre de antibiótico.

III.2.5. ELABORACIÓN DE LECHE FERMENTADAS CON DIFERENTES CEPAS TESTEADAS.

Se elaboraron leches fermentadas a partir de la siguiente formulación: 13% de LPE (Nestlé, Francia) disuelta en agua destilada a 50°C, agitando 10 min. Se pasteurizó a 75°C, se enfrió a 50°C y se adicionaron 10% de sacarosa y 3% de WPC (35% de proteínas, Bayolan, BMI, Alemania), se agitó 10 min. Se adicionaron luego 1% de almidón modificado de mandioca (Glutal S.A., Arg.), 0,3% Gelatina bovina (PB Leiner, Arg.) y 0,5% de Goma Espina Corona (NatureGum, Arg.).

Se homogeneizó la base láctea obtenida por Ultraturrax a 24000 rpm durante 5 min, se adicionó sorbato de potasio (250 ppm), se agitó 10 min y se calentó nuevamente a 85°C para favorecer la dilución e hidratación de los insumos secos incorporados. Por último, se ajustó la temperatura a 40°C, se adicionó cloruro de calcio (200 ppm), cultivo starter YC-180 (en la misma concentración descrita en el protocolo de elaboración de leches fermentadas, apartado III.1.2.2.) y se inoculó uno de los microorganismos a ensayar (en un orden de 10^7 - 10^9 UFC.mL⁻¹, según la cepa, ajustando por DO) y se fermentó a 39°C. El proceso fermentativo se detuvo al alcanzar un pH = 5. Se enfrió en baño de agua helada y se conservó en heladera, envasado herméticamente.

III.2.5.1. Preparación del cultivo del microorganismo para inocular.

Células frescas, provenientes de dos cultivos consecutivos, de 24 horas (para lactobacilos) y 48 hs (para bifidobacterias) de incubación cada uno, fueron centrifugadas a 6000 rpm 15 min, sus DO fueron ajustadas a 0,8 y 1, respectivamente, con solución salina (25 mL), a una longitud de onda de 620 nm. Posteriormente, se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones antes descrita, y la masa celular obtenida fue distribuida en 250 gr de producto antes de la fermentación, siendo la concentración lograda en la base láctea lista para fermentar estimada en el orden de 10^7 - 10^9 UFC.mL⁻¹ para lactobacilos y bifidobacterias respectivamente.

Las cepas utilizadas en los productos fueron: *L. rhamnosus* Sp1 (liofilizado comercial); *L. acidophilus* Barilla (BUSCOB); *B. animalis* ssp. *lactis* MB29 (BUSCOB) y *B. longum* ssp. *longum* B1835 (BUSCOB).

III.2.5.2. Ensayos de resistencia a condiciones gastrointestinales simuladas de las cepas contenidas en el producto.

Se realizaron diluciones seriadas en solución salina, partiendo de 1 gr de producto, y diluyendo en 9 mL del disolvente, se agitó enérgicamente y se tomó 100 µL de la solución, para ser incorporado a un Eppendorf con 900 µL de disolvente y continuando con las demás diluciones. Las diluciones desde 10^{-5} hasta 10^{-8} para lactobacilos y desde 10^{-6} a 10^{-9} para bifidobacterias se inocularon en superficie con la técnica de la microgota (10 µL) sobre MRS-Bilis 0,15% o TPY-Mupirocina agar respectivamente. Luego se incubaron en anaerobiosis a 37°C durante 48 horas.

III.2.5.2.1. Resistencia a bajo pH (2,5) + pepsina

Se tomó 1 gr de producto, el cual se adicionó con 9 mL de PBS con solución de pepsina (Sigma-Aldrich) en 3 g/L, y pH ajustado a 2,5 con HCl. Se realizó un ajuste final del pH, luego de la adición del producto, con 0,1 N HCl y se agitó vigorosamente. A los 90 min se tomaron 0.2 mL de muestra para hacer la dilución seriada en solución salina estéril y seguidamente realizar el recuento en placa MRS-Bilis 0,15% o TPY-Mupirocina agar utilizando la técnica microgotas (10 μ L). Se inocularon las diluciones desde 10^{-1} a 10^{-4} y de 10^{-5} a 10^{-8} para lactobacilos y bifidobacterias, respectivamente. Se incubó a 37°C por 48 horas.

III.2.5.2.2. Resistencia a bilis (2%)

Se tomó 1 gr de producto, el cual se adicionó con 9 mL de PBS adicionados con 2% de sales biliares (Oxoid), con pH ajustado a 8 con NaOH. Se realizó un ajuste final del pH, luego de la adición del producto, con 0,1 N NaOH y se agitó vigorosamente. A las 4 horas se tomó 1 mL de muestra para hacer la dilución seriada en solución salina estéril y así realizar el recuento en placa MRS-Bilis 0,15% o TPY-Mupirocina agar mediante la técnica de microgotas (10 μ L). Se inocularon las diluciones desde 10^{-5} a 10^{-8} y se incubaron en anaerobiosis durante 48 horas a 37°C.

III.2.6. LIOFILIZACIÓN DE CEPAS IDENTIFICADAS.

Se cultivaron las cepas puras correctamente identificadas en 10 mL de caldo MRS y TPY (según corresponda), incubando 24 horas en anaerobiosis a 37°C.

Se centrifugó y se recogió el precipitado en 1 mL de leche descremada. Se colocaron 0.25 mL en 4 probetas de vidrio previamente acondicionadas, rotuladas y esterilizadas. Se congelaron a -130°C, se liofilizaron durante una noche y se cerraron bajo vacío. Se anexó sílice como indicador para chequear la efectividad del cierre del envase en el tiempo.

Se archivaron en la colección ceparia BUSCOB, de la Universidad de Bologna.

Capítulo IV

Resultados y Discusión

IV.1. CUANTIFICACIÓN DEL COLESTEROL.

Para ambos casos de estudio, se tomaron muestras aleatorias de leche antes y después de la extracción de colesterol con β -CD. El contenido promedio de colesterol antes y después del tratamiento con β -CD fue $14,391 \pm 1,063$ y $1,971 \pm 0,539$ mg cada 100 g de leche, respectivamente, logrando de esta manera, un porcentaje de extracción promedio de $86,405 \pm 2,736$ %. De acuerdo con el Código Alimentario Argentino (2010), sobre normas para la rotulación y publicidad de alimentos, si un alimento contiene menos de 5 mg de colesterol cada 100 g de producto puede ser denominado *sin colesterol* y con menos de 20 mg% como *bajo en colesterol*, pero en ambos casos el alimento debe contener un máximo de 1,5 g de grasa saturada (GS) cada 100 g de alimento y la energía aportada por la GS no debe ser mayor a 10% del valor energético total. En el presente trabajo si bien se obtuvieron leches fermentadas con menos de 5 mg% de colesterol remanente, el método utilizado para la extracción del compuesto mantiene el contenido de GS (cerca de 2 g de GS cada 100 g de leche fermentada), no pudiendo clasificar los productos dentro del marco de la regulación vigente. Sin embargo, actualmente, esta clasificación general no se ajustaría adecuadamente al rol de la GS de la leche y productos lácteos de acuerdo a lo establecido en numerosos trabajos de investigación. De acuerdo a Parodi (2009) existe suficiente evidencia para suponer que la mayoría de los AGS presentes en la leche serían aterogénicamente neutros, por lo tanto no incrementarían el riesgo de padecer enfermedades cardíacas coronarias, además que el riesgo de padecer este tipo de enfermedades depende también de la presencia de otros factores de riesgo no menos importantes (como obesidad, hipertensión, diabetes, entre otros) y por otro lado, la leche contiene otros agentes antiaterogénicos como antioxidantes y calcio. El producto en estudio podría rotularse como “con colesterol reducido en más del 85 %”, que es una característica comercialmente aprovechable.

Es importante aclarar que, salvo la LPE, ninguno de los ingredientes (aditivos) restantes aporta cantidades significativas de colesterol al producto final. Por ende, partiendo de una mezcla base inicial con niveles mínimos de colesterol, se obtienen leches fermentadas con contenido de colesterol reducido notoriamente respecto al valor inicial.

IV.2. CASO DE ESTUDIO 1: EFECTO DEL CONTENIDO DE HIDROCOLOIDES SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS, REOLÓGICAS, TEXTURALES, MICROBIOLÓGICAS Y SENSORIALES DE LECHE FERMENTADAS PROBIÓTICAS CON COLESTEROL REDUCIDO.

La tabla IV.1. muestra el diseño de Box-Behnken con el set de corridas experimentales y los respectivos valores de las variables codificadas y sin codificar para el caso de estudio 1, donde se investigó el efecto del contenido de hidrocoloides sobre las características fisicoquímicas, reológicas, texturales, microbiológicas y sensoriales de leches fermentadas probióticas con colesterol reducido.

Tabla IV.1. Corridas experimentales del diseño de Box-Behnken para el estudio de hidrocoloides con los valores de las variables codificadas y sin codificar. (%G: % m/m Gelatina (X_1), %AMM: %m/m Almidón modificado de mandioca (X_2), %GEC: %m/m Goma espina corona (X_3)).

Exp N°	Variables no codificadas			Variables codificadas		
	%G	%AMM	%GEC	X_1	X_2	X_3
1*	0,3	0,5	0,25	0	0	0
2	0,6	1	0,25	1	1	0
3	0	1	0,25	-1	1	0
4	0	0	0,25	-1	-1	0
5	0,6	0	0,25	1	-1	0
6	0,3	1	0	0	1	-1
7	0	0,5	0	-1	0	-1
8	0,3	0	0	0	-1	-1
9	0,6	0,5	0	1	0	-1
10	0,3	1	0,5	0	1	1
11	0	0,5	0,5	-1	0	1
12	0,3	0	0,5	0	-1	1
13	0,6	0,5	0,5	1	0	1
14*	0,3	0,5	0,25	0	0	0

14 experiencias, con una repetición del punto central (*)

En los casos que se encontraron modelos de regresión significativos que permitieron ver el efecto de las variables sobre las respuestas estudiadas, se informó los coeficientes de los términos significativos junto con los estadísticos correspondientes que permitieron evaluar la calidad del ajuste del modelo para ver la precisión de la

predicción obtenida. Dentro de los estadísticos que se emplearon en este trabajo para evaluar la calidad del ajuste, los coeficientes de determinación R^2 y R^2 -ajustado, miden la proporción o porcentaje de variabilidad de los datos experimentales que es explicada por el modelo. Para fines de predicción se estableció que tomen valores mayores o igual a 0,7 (es decir que expliquen al menos el 70% de la variabilidad de los datos). Cuando hay muchos factores, se prefirió el R^2 -ajustado en lugar de R^2 , puesto que este último se incrementa de manera artificial con cada término que se agrega al modelo, aunque sea un término que no contribuya mucho a la respuesta. En cambio, el R^2 -ajustado incluso baja de valor cuando el término que se agrega no es significativo. Por otro lado, la prueba de falta de ajuste es útil cuando se quiere verificar si el orden del modelo es el correcto. Debe ser no significativa ($p > 0,05$) para decir que el modelo se ajusta de manera adecuada a los datos (Gutierrez Pulido, de la Vara Salazar, 2008).

Por otro lado, si el valor-p del término del modelo es menor al valor-p prefijado ($p < 0,1$), se concluye que el término influye en la variable de respuesta. A su vez, se estableció un orden de significancia para saber cuál de los términos resultó más significativo que otro y de esta manera ver cuál influye más en la respuesta. Cuanto menor es el valor-p del término, más significativo se lo considera.

Por último siempre, en todas las respuestas estudiadas, se trató de obtener modelos que sean jerárquicos, es decir que contengan todos los términos más simples que componen los términos de mayor orden que están en el modelo. Esto es porque, para el análisis de superficie de respuesta se prefieren los modelos jerárquicos, ya que tienen un comportamiento más estable y suave (Gutierrez Pulido, de la Vara Salazar, 2008).

IV.2.1. ANÁLISIS DE LA CINÉTICA DE ACIDIFICACIÓN DURANTE LAS FERMENTACIONES.

En la figura IV.1. se observa la evolución del pH y acidez titulable (mol/L de ácido láctico) en función del tiempo (minutos), durante la fermentación de la experiencia 10. Un comportamiento similar se observó en las demás muestras estudiadas del diseño factorial, en las cuales se obtuvieron curvas del tipo sigmoideas (decreciente para pH y creciente para acidez), típicas de este tipo de fermentaciones. Esto se fundamenta en base al ciclo de crecimiento de la población bacteriana. Al inicio del proceso se produce la fase de latencia del cultivo microbiano donde las bacterias se adaptan al medio, lo cual se manifiesta con una disminución leve del pH y un aumento moderado de la

acidez. Posteriormente, durante la fase exponencial de crecimiento y desarrollo del cultivo, las bacterias presentan la mayor actividad metabólica fermentativa, consumiendo los nutrientes del medio (principalmente lactosa) y generando ácidos orgánicos (principalmente ácido láctico) que contribuyen al descenso brusco del pH y al aumento pronunciado de la acidez titulable. Esto genera una desestabilización de la estructura micelar, y comienza la coagulación de las caseínas. En las etapas finales de la fermentación la velocidad de variación del pH y acidez disminuye, probablemente debido a que las bacterias comienzan a ser inhibidas por la acidez y el pH propios del medio.

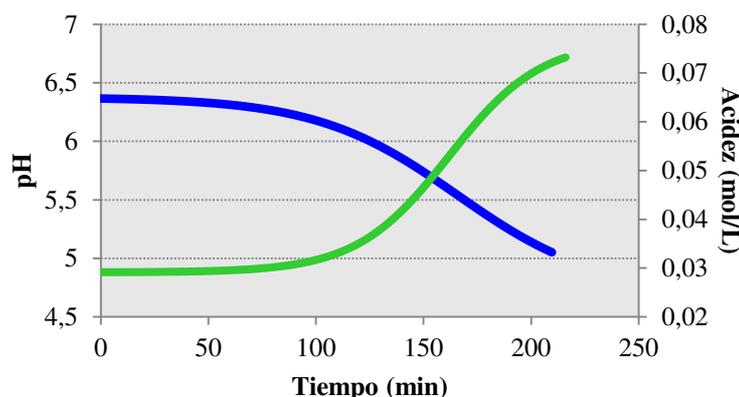


Figura IV.1. Curvas de pH (azul) y acidez (verde) en función del tiempo de fermentación para la experiencia 10, del caso de estudio 1.

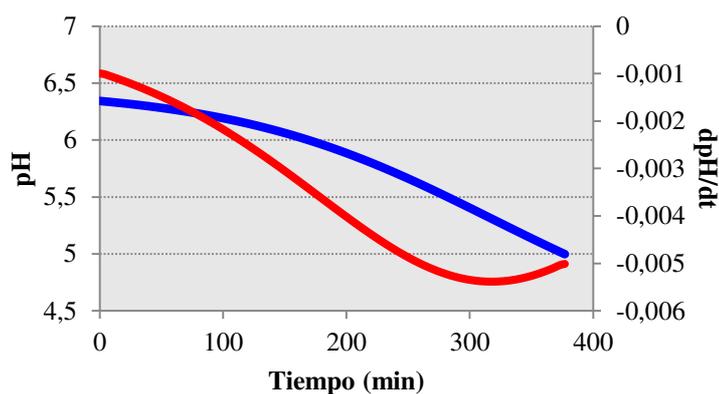
Con los datos obtenidos de pH en función del tiempo de fermentación de cada experiencia, se calcularon los parámetros: $V_{m\acute{a}x}$, $t_{V_{m\acute{a}x}}$, $pH_{V_{m\acute{a}x}}$, t_{fin} (Tabla IV.2.).

Los valores absolutos de $V_{m\acute{a}x}$ variaron entre $5,38 \cdot 10^{-3}$ upH.min⁻¹ (muestra 7: sin G y GEC, intermedio de AMM) y $12,74 \cdot 10^{-3}$ upH.min⁻¹ (muestra 10: sin G y máximo GEC y AMM). Las figuras IV.2. a) y b) muestran la evolución de pH y su derivada (dpH/dt) durante el tiempo de fermentación para las experiencias 7 y 10. Como puede observarse, la muestra 7 demora mucho más tiempo que la experiencia 10 en llegar a la $V_{m\acute{a}x}$ (mínimo de la gráfica dpH/dt), siendo ésta menor (en valor absoluto) en el caso de la muestra 7. Esto va de acuerdo, con el tiempo requerido para llegar a la $V_{m\acute{a}x}$ que fue de 2,14 horas (para el caso de la muestra 10) y 5,27 horas (para el caso de la muestra 7).

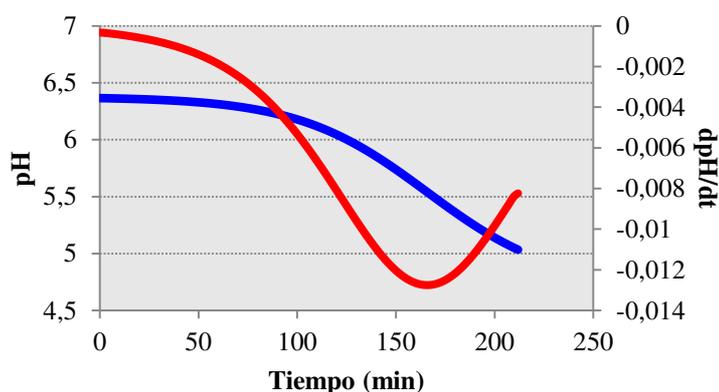
En general, se observó que cuanto mayor sea el $t_{V_{m\acute{a}x}}$, menor fue la actividad acidificante ($< V_{m\acute{a}x}$). El pH para lograr la velocidad máxima ($pH_{V_{m\acute{a}x}}$) varió entre 5,32 (muestra 7: sin G y GEC, nivel intermedio de AMM) y 5,69 (muestra 5: máximo G, sin AMM, e intermedio GEC).

Tabla IV.2. Valores de $V_{m\acute{a}x}$ (valor absoluto), $t_{V_{m\acute{a}x}}$, $pH_{V_{m\acute{a}x}}$ y t_f para las cinéticas de acidificación de las diferentes muestras del caso de estudio 1.

Exp. N°	$V_{m\acute{a}x}$ ($\cdot 10^{-3} \text{upH}\cdot\text{min}^{-1}$)	$t_{V_{m\acute{a}x}}$ (h)	$pH_{V_{m\acute{a}x}}$	t_f (h)
1	9,72	2,66	5,51	3,08
2	10,2	2,71	5,60	3
3	11,97	3,50	5,56	3,72
4	6,65	3,24	5,35	4,33
5	13,2	2,34	5,69	2,87
6	11,37	2,52	5,46	3,33
7	5,38	5,27	5,32	6,28
8	5,76	2,76	5,40	5,82
9	12,45	2,22	5,6	3,33
10	12,74	2,14	5,53	3,53
11	11,55	3,10	5,5	4,2
12	12,01	2,24	5,51	3,12
13	12,7	2,42	5,65	3,07
14	11,12	2,76	5,62	3,85



a



b

Figura IV.2. Curvas de pH (azul) y dpH/dt (roja) en función del tiempo de fermentación (min) para las muestras 7 (a) y 10 (b), correspondientes a las leches fermentadas probióticas con colesterol reducido del caso de estudio 1.

Por último, el tiempo que duró la fermentación (t_{fin}) varió entre 2,87 y 6,28 horas (muestra 5 y 7, respectivamente). Se encontró que fue significativamente mayor en aquellas muestras donde dos de los hidrocoloides se encontraban ausentes y el tercero en concentración intermedia (experiencias 7, 8 y 4).

A partir del ANOVA (Tabla IV.3.) se puede ver que los modelos de predicción desarrollados para los parámetros cinéticos calculados resultaron altamente significativos ($p < 0,001$) y adecuados. El test F para la falta de ajuste en el análisis de variancia mide la falla del modelo en representar los datos en el dominio experimental. Puede observarse, que la falta de ajuste, basada en el error puro, no es significativa ($p > 0,05$), lo cual es adecuado. Los coeficientes R^2 y R^2 -ajustado permiten explicar que los modelos hallados explican más del 80% de la variabilidad de los datos experimentales.

Tabla IV.3. Coeficientes de regresión del modelo polinomial de segundo orden para las respuestas $V_{m\acute{a}x}$, $pH_{V_{m\acute{a}x}}$, $t_{V_{m\acute{a}x}}$ y t_f y estadísticos obtenidos a partir del análisis ANOVA de cada modelo para las leches fermentadas probióticas con colesterol reducido del caso de estudio 1.

Factores	Respuestas			
	$V_{m\acute{a}x}$	$pH_{V_{m\acute{a}x}}$	$t_{V_{m\acute{a}x}}$	t_{fin}
C	0,010	5,55	2,51	3,56
X ₁	$1,37 \cdot 10^{-3**}$	0,10 ^{***}	-0,58 ^{***}	-0,78 ^{***}
X ₂	$1,34 \cdot 10^{-3**}$	0,025		-0,32
X ₃	$1,76 \cdot 10^{-3**}$	0,051 [*]	-0,46 ^{**}	-0,61 ^{**}
X ₁ .X ₂	$-1,57 \cdot 10^{-3*}$	-0,075 ^{**}		
X ₂ .X ₃	$-1,48 \cdot 10^{-3*}$			0,72 ^{**}
X ₁ .X ₃	$-1,22 \cdot 10^{-3*}$		0,79 ^{***}	0,45
X ₁ ²			0,49 [*]	
X ₂ ²				
X ₃ ²		-0,059 [*]		0,53 [*]
Estadísticos				
R^2	0,9280	0,9023	0,8938	0,9147
R^2 -ajustado	0,8662	0,8413	0,8456	0,8416
valor-F	15,03	14,78	18,93	12,51
Falta de ajuste (valor-p)	0,6715	0,9290	0,1617	0,3241

Significancia: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

A través del análisis de los coeficientes lineales de las ecuaciones de regresión múltiples obtenidas con las variables del diseño codificadas, se observó que al incrementar la concentración de espesantes (GEC principalmente), la $V_{m\acute{a}x}$ se incrementa. Las interacciones entre duplas de hidrocoloides (X₁.X₂, X₁.X₃ y X₂.X₃)

resultaron significativas, no así los términos cuadráticos. En la figura IV.3. a) se observa la gráfica de superficie de respuesta para $V_{m\acute{a}x}$, en función de G y GEC, manteniendo AMM constante en su proporción intermedia, donde el aumento de los hidrocoloides estudiados afectan la velocidad de reducción del pH de las bacterias que participan en la fermentación.

Para el caso del $pH_{V_{m\acute{a}x}}$ el término lineal de la G (X_1) fue el más significativo dentro de los términos lineales mientras que el AMM (X_2) no resultó ser significativo. Sin embargo, debido a la presencia de la interacción $X_1.X_2$, donde participa X_2 , se decidió colocar X_2 dentro del modelo para respetar que el modelo sea jerárquico. A través de la gráfica de superficie de respuesta (figura IV.3. b) puede verse que al aumentar la concentración de G (principalmente) y GEC aumenta el valor de pH al cual se llega a $V_{m\acute{a}x}$, manteniendo AMM constante en su nivel intermedio.

Por su parte, $t_{V_{m\acute{a}x}}$ depende de manera inversa de G y GEC, es decir que un aumento en el contenido de estos dos aditivos induce la disminución del tiempo al cual se llega a la $V_{m\acute{a}x}$. Esto se puede observar en los coeficientes negativos de los términos lineales significativos de los modelos predichos (tabla IV.3.) y en la figura IV.3. c).

De la misma manera, el tiempo que duró la fermentación (t_{fn}) fue significativamente disminuido por G y GEC (Figura IV.3. d). X_1 (correspondiente a G) fue el factor que afectó más significativamente el valor de esta respuesta, siendo aquellas muestras con mayor contenido de este gelificante las que menos tardaron en llegar al punto de corte de la fermentación (pH = 5).

Para todos los casos se obtuvieron modelos reducidos significativos, que ajustaron adecuadamente con los datos experimentales. Se vio que la concentración de hidrocoloides afecta significativamente los parámetros cinéticos estudiados, produciendo un aumento de la tasa máxima de acidificación ($V_{m\acute{a}x}$), que se traduce en un pH mayor y un tiempo menor para el cual se llega a dicha velocidad y menor tiempo de fermentación. Esto significaría que los hidrocoloides promoverían el crecimiento de las bacterias acidolácticas encargadas del proceso fermentativo y aumentarían la actividad de estos microorganismos. Resultados similares se observaron al adicionar estabilizantes como gelatina, pectina o alginato de sodio en yogures fortificados con soja (Kumar y Mishra, 2004). Por otro lado, diversos estudios (Karaca y col. 2013, Tuohy y col., 2001) apoyan la capacidad como prebióticos que tienen otros estabilizantes como la goma guar y pectina que al ser utilizados en diferentes alimentos, además de promover el desarrollo de las bacterias probióticas, impiden el crecimiento

de indeseables (como *Escherichia*, *Clostridium*, entre otros). Basados en lo expuesto, sería interesante profundizar el estudio sobre el efecto de los tres hidrocoloides aquí ensayados, y verificar estos resultados iniciales respecto a la posible acción como posibles prebióticos (principalmente la espina corona, por su similitud estructural con la goma guar).

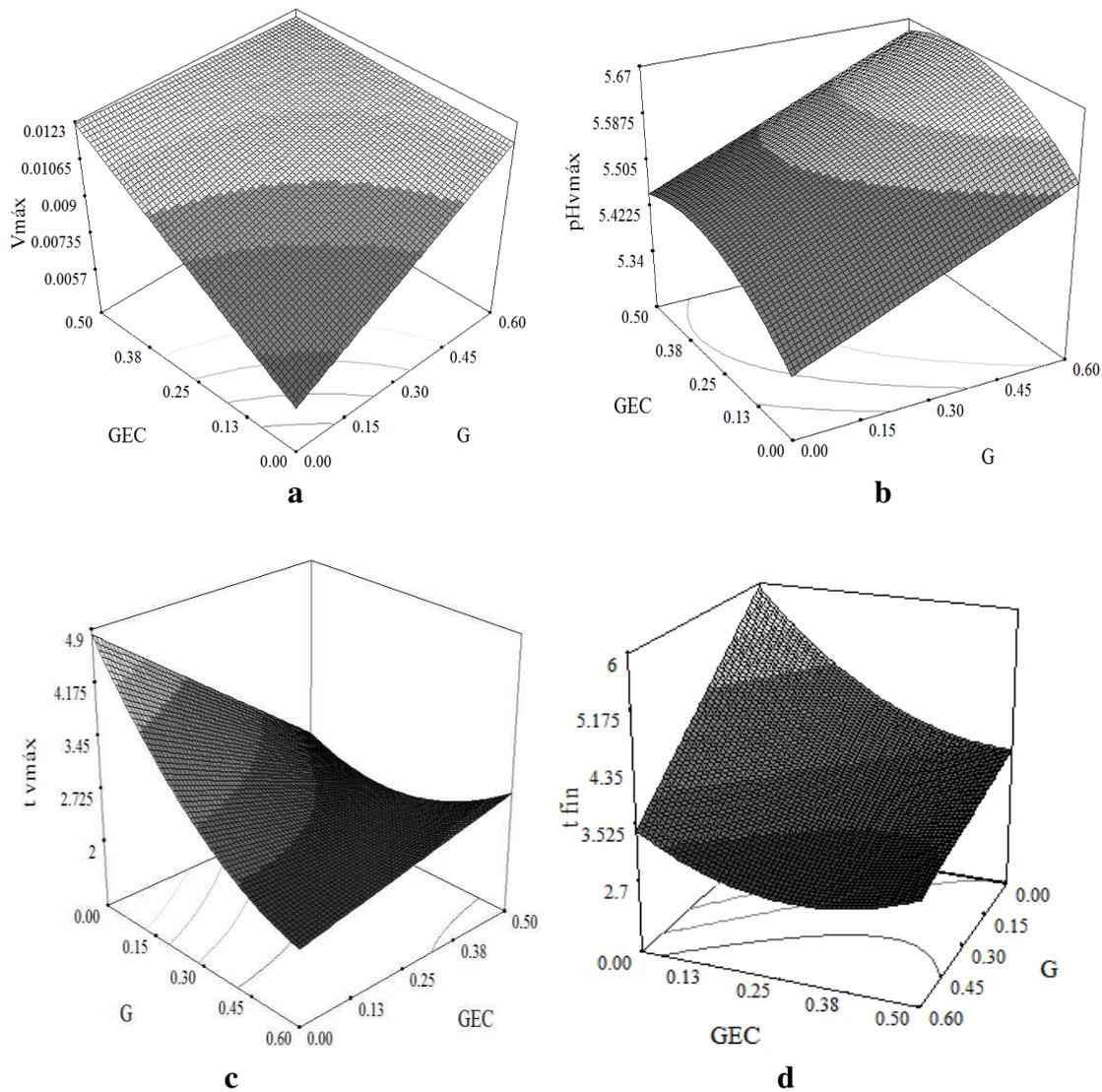


Figura IV.3. Gráficas de superficie de respuesta para: a) $V_{m\acute{a}x}$, b) $pH_{v_{m\acute{a}x}}$, c) $t_{v_{m\acute{a}x}}$, d) t_{fin} , en función de la concentración de G y GEC, manteniendo constante AMM y en su nivel intermedio, para el caso de estudio 1.

IV.2.2. ANÁLISIS DE LA VARIACIÓN DE pH Y ACIDEZ TITULABLE DURANTE LA VIDA ÚTIL.

La tabla IV.4. indica los valores medios de pH y acidez obtenidos durante el almacenamiento de las diferentes leches fermentadas probióticas con colesterol

reducido, para el caso de estudio 1. Adicionalmente, se observan los porcentajes de variación (%V) entre fin e inicio de vida útil para ambos parámetros.

El seguimiento del pH durante la vida útil de las leches fermentadas demostró que la mayoría de las muestras, sufrieron una disminución significativa en los valores de pH más pronunciada durante la primer semana de almacenamiento (a los 3 días de elaboradas), con un valor promedio de $4,62 \pm 0,18$ (desde el valor de corte de la fermentación, pH=5) y luego manifestaron un descenso más paulatino de este parámetro hasta alcanzar un valor promedio de $4,24 \pm 0,11$ en la última semana de vida útil (a los 31 días). Este hecho concuerda, con lo informado por Rojas Castro y col. (2007) que establecen que la formación de ácido láctico provoca un descenso en el pH durante el almacenamiento de las leches fermentadas (postacidificación) debido a que los microorganismos “iniciadores” quedan viables y, por consiguiente, con metabolismo activo aunque disminuido debido al efecto de la baja temperatura durante la refrigeración. Así mismo al final del almacenamiento, todas las muestras (independientemente de su formulación) llegan a estabilizar su pH. Este comportamiento puede apreciarse en la figura IV.4.

La muestras 1 y 6 resultaron ser las de mayor y menor pH hacia el fin de la vida útil (pH = 4,52 y 4,05, respectivamente). En general la variación porcentual fue menor o igual al 10% en toda la vida útil. Por su parte, la muestra 10 (con máxima concentración de AMM y GEC e intermedia de G) fue la que menos variación de este parámetro sufrió durante el almacenamiento ($V\% = 2,21\%$), mientras que la muestra 11 (sin G, intermedio AMM y máximo GEC) presentó el comportamiento opuesto ($V\% = 13,43\%$). No pudo encontrarse un comportamiento definido de los valores de pH promedios en función de la composición de las muestras; tal variación observada podría tener que ver con el efecto de ciertos factores que afectan el pH, como la velocidad de enfriamiento (eficacia de la transferencia térmica) de las muestras una vez finalizada la fermentación y la temperatura refrigeración de las mismas, que muchas veces resulta difícil estandarizar y lograr condiciones similares (Gomez Heras, 1999).

Tabla IV.4. Valores medios de pH y acidez (mol/L ácido láctico) y porcentaje de variación de los mismos (V%, expresados en valor absoluto) durante el almacenamiento de las diferentes experiencias de leches fermentadas probióticas con colesterol reducido, para el caso de estudio 1.

Exp. N°	pH en el almacenamiento						Acidez en el almacenamiento					
	Días					V% pH	Días					V% Ac
	3	10	17	24	31		3	10	17	24	31	
1	4,88	4,54	4,61	4,42	4,52	7,38	0,1045	0,1097	0,1017	0,1122	0,1214	16,15
2	4,67	4,29	4,23	4,22	4,19	10,29	0,1022	0,1195	0,1258	0,1273	0,1307	27,88
3	4,51	4,24	4,18	4,31	4,27	5,43	0,1075	0,1179	0,1185	0,1207	0,1228	14,29
4	4,69	4,33	4,26	4,20	4,21	10,25	0,0971	0,1149	0,1217	0,1245	0,1287	32,54
5	4,73	4,46	4,36	4,39	4,30	9,10	0,0956	0,1113	0,1103	0,1199	0,1213	26,92
6	4,54	4,15	4,02	4,00	4,05	10,90	0,1099	0,1352	0,1400	0,1439	0,1519	38,28
7	4,46	4,26	4,42	4,22	4,17	6,51	0,1100	0,1266	0,1278	0,1297	0,1361	23,77
8	4,44	4,16	4,15	4,25	4,22	4,95	0,0904	0,1226	0,1195	0,1307	0,1238	36,91
9	4,67	4,45	4,33	4,27	4,34	6,97	0,0993	0,1165	0,1198	0,1405	0,1278	28,74
10	4,31	4,14	4,17	4,23	4,21	2,21	0,1240	0,1264	0,1274	0,1399	0,1285	3,56
11	5,03	4,87	4,58	4,38	4,35	13,43	0,0867	0,0981	0,1122	0,1263	0,1277	47,22
12	4,54	4,18	4,08	4,08	4,14	8,82	0,1068	0,1268	0,1368	0,1414	0,1323	23,90
13	4,55	4,35	4,45	4,30	4,20	7,69	0,1060	0,1282	0,1373	0,1359	0,1388	31,01
14	4,69	4,33	4,26	4,20	4,21	10,25	0,0971	0,1149	0,1217	0,1245	0,1287	32,54

Los errores estándares fueron menores al 5%.

$$V\%pH = (pH_{\text{día 31}} - pH_{\text{día 3}}) / (pH_{\text{día 3}}) * 100$$

$$V\%Ac = (Acidez_{\text{día 31}} - Acidez_{\text{día 3}}) / (Acidez_{\text{día 3}}) * 100$$

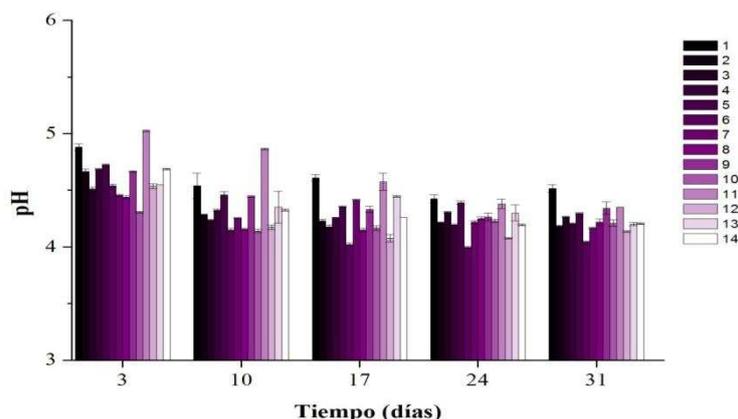


Figura IV.4. Evolución del pH durante el almacenamiento para las diferentes muestras de leches fermentadas, correspondientes al caso de estudio 1.

Con respecto a la evolución de la acidez titulable durante el almacenamiento de las leches fermentadas, se observó un incremento progresivo en la concentración de ácido láctico, desde un valor de acidez promedio de $0,103 \pm 0,009$ mol/L (a los 3 días de finalizada la elaboración), hasta alcanzar un valor promedio de $0,130 \pm 0,008$ mol/L (al día 31). Al igual que con lo ocurrido con el pH, la acidez varió (se incrementó), de manera más acentuada, durante la primera semana, llegando a estabilizarse al final de la vida de anaquel (figura IV.5.). El incremento se debe a la producción principalmente de ácido láctico, a partir de la lactosa, por acción de las bacterias lácticas, que durante el almacenamiento recibe el nombre de postacidificación. Probablemente, la estabilización del pH y acidez titulable de las muestras al final del almacenamiento, se debe a la inhibición de la actividad enzimática de los cultivos iniciadores, a la disminución del desarrollo bacteriano, de los nutrientes y, en menor medida, al agotamiento de las reservas de lactosa (Tamime y Robinson, 1999).

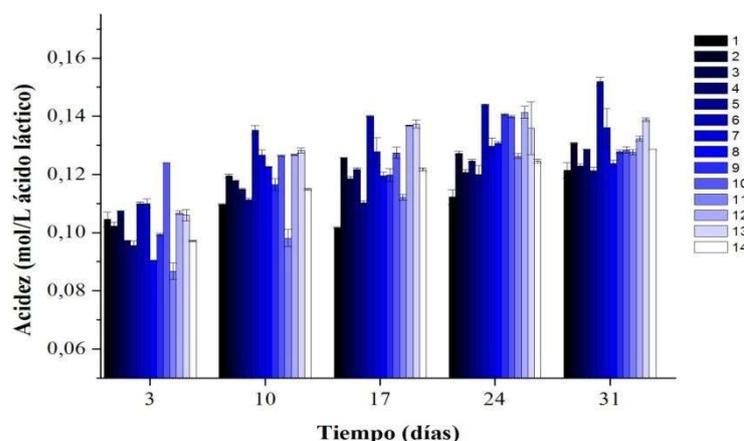


Figura IV.5. Evolución de la acidez titulable durante el almacenamiento para las diferentes muestras de leches fermentadas, correspondientes al caso de estudio 1.

La muestra 1 fue la menos ácida al fin de vida útil, ocurriendo lo contrario con la muestra 13. A diferencia de lo ocurrido con el pH, las variaciones porcentuales entre fin e inicio de vida útil fueron mayores y muy disímiles entre las diferentes muestras, variando desde 3,5% (para la muestra 10) hasta un 47% (para la muestra 11), lo cual es una característica recurrente en sistemas alimenticios complejos donde se desarrollan microorganismos agregados como fermento acidificante. Por todo lo mencionado, se destaca la importancia del control del pH y acidez titulable durante la vida útil de las leches fermentadas obtenidas, debido a que ambos parámetros se modifican durante el almacenamiento y, además, influyen sobre la calidad y aceptabilidad de los productos elaborados.

IV.2.3. ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA.

Se determinó la composición química promedio de cada muestra de leche fermentada, tal como se observa en la tabla IV.5.

Tabla IV.5. Composición química promedio (% m/m) para las diferentes experiencias de leches fermentadas al día 17 de almacenamiento para el caso de estudio 1.

Exp. N°	% Cenizas	% Grasa	% Proteína total	% Hidratos de Carbono	% Sólidos totales	% Humedad
1	0,99	2,88	4,25	16,49	24,61	75,39
2	0,97	2,66	4,37	17,11	25,11	74,89
3	0,93	3,43	3,43	17,1	24,89	75,11
4	1,01	2,87	3,41	17,42	24,71	75,29
5	0,93	3,67	3,94	16,8	25,34	74,66
6	0,93	3,67	4,10	16,4	25,10	74,9
7	0,92	3,64	3,89	15,23	23,68	76,32
8	0,89	3,10	4,17	15,83	23,99	76,01
9	0,95	3,31	5,27	16,1	25,63	74,37
10	0,92	2,85	4,01	17,54	25,32	74,68
11	0,96	3,38	4,12	16,88	25,34	74,66
12	0,91	3,60	4,09	16,05	24,65	75,35
13	0,94	3,58	4,53	15,91	24,96	75,04
14	1,03	2,87	4,36	16,45	24,71	75,29

En todos los casos los errores estándares fueron menores al 5%.

Los porcentajes de proteínas totales variaron entre las diferentes muestras, evidenciando un mayor contenido en aquellas con mayor contenido de gelatina (Exp. 9, 13 y 2, en ese orden) esto puede deberse a que la gelatina aporta 84-90 % de proteína (proveniente de colágeno), mientras que el almidón modificado de mandioca

(polisacárido) y la espina corona (galactomanano) tienen muy baja proporción de proteínas, por lo que su contribución sería prácticamente nula. También aportan proteínas el WPC35 y las LPE que se utilizan en la formulación de las leches fermentadas. Los valores hallados se encuentran dentro de los teóricos calculados (Anexo I).

El porcentaje de hidratos de carbono (% HC) de cada experiencia, se obtuvo por diferencia entre el valor de sólidos totales y la suma de los valores de cenizas, grasas y proteínas. La proporción elevada de éstos, en las muestras, se debe a la presencia de lactosa, sacarosa, espina corona (que se compone de un 70 % de carbohidratos) y al almidón modificado de mandioca (aproximadamente 84 % de HC) utilizados y principalmente a la sacarosa agregada (10 %), práctica habitual a nivel industrial (Spreer, 1991). La gelatina no influye, ya que su composición es mayoritariamente proteica.

Algunos valores de grasas estuvieron un poco por debajo del valor teórico esperado (aproximadamente 3,5%, ver Anexo I).

El valor de cenizas está comprendido por las sales que aportan las materias primas, así como también la adición de cloruro de calcio.

Finalmente, a modo de ejemplo (figura IV.6.) se presenta un gráfico circular de la composición porcentual promedio para uno de las muestras (exp. N°1).

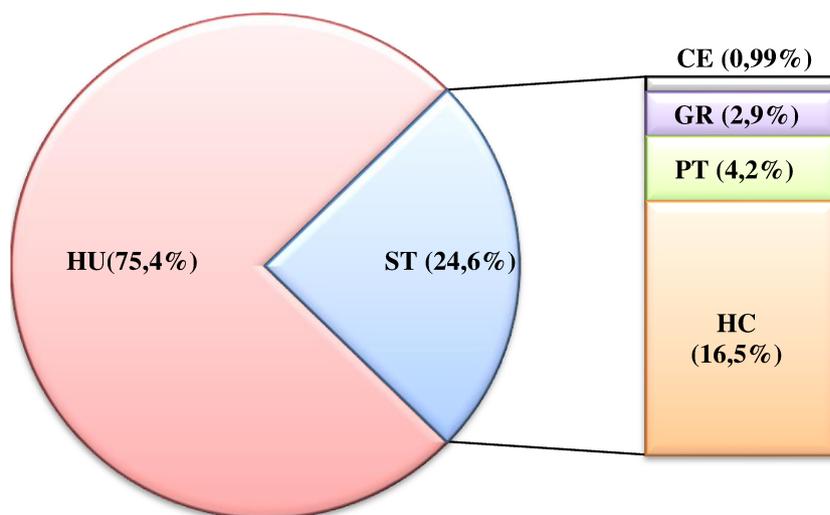


Figura IV.6. Gráfico de la composición porcentual promedio para la muestra 1, correspondiente al caso de estudio 1. HU: humedad, ST: sólidos totales, CE: cenizas, GR: grasas, PT: proteína total, HC: hidratos de carbono.

IV.2.4. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD DE AGUA.

La tabla IV.6. muestra los promedios de actividad acuosa (a_w) para cada una de las experiencias al día 17 de vida útil, junto con la temperatura correspondiente a la cual se realizó la determinación. Como puede observarse, a_w se mantuvo prácticamente constante entre las diferentes muestras, por ende se adoptó un valor promedio general de $0,980 \pm 0,001$, muy elevado y característico de los productos con alta humedad. Como este parámetro está relacionado con el agua libre (disponible en un alimento), puede ser utilizada por los microorganismos para su metabolismo, promoviendo una elevada viabilidad no solo de las bacterias lácticas iniciadoras y del microorganismo probiótico empleado, sino también de otros (hongos alterantes) por lo cual debe tenerse especial cuidado, con contaminaciones que alteren la calidad del producto.

Tabla IV.6. Actividad acuosa (a_w) promedio de todas las experiencias al día 15 de almacenamiento, correspondiente al caso de estudio 1.

Exp. N°	Actividad Acuosa (a_w)	Temperatura (°C)
1	0,982	24,2
2	0,982	25,3
3	0,981	23,6
4	0,982	24,1
5	0,979	24,5
6	0,982	24,8
7	0,976	24,2
8	0,981	24,2
9	0,980	23,8
10	0,981	25,6
11	0,977	24,8
12	0,980	23,7
13	0,984	24,8
14	0,982	26,7

Los errores estándares fueron menores al 5%.

IV.2.5. ANÁLISIS DE LA RETENCIÓN DE AGUA.

IV.2.5.1. Determinación del índice de retención de agua por acción de la gravedad.

El índice de retención de agua (IRA%) puede ser visto como una medida inversa a la separación de suero (sinéresis). Visto de esta manera, a partir de la tabla IV.7. se puede observar que ninguna muestra evidenció sinéresis (100% IRA), al día 3 posterior a la elaboración pero en las posteriores mediciones (días 17 y 31) este parámetro, en

general, aumentó (por mayor eliminación de suero y por ende menor retención de agua), aunque en muy pequeña proporción (IRA % mayor a 99,5 %), siendo la muestra 7 (sin G ni GEC, intermedio AMM) la que presentó mayor desuerado hacia el fin de vida útil. Esto corrobora la importancia del agregado de ambos hidrocoloides que contribuyen a una mayor estabilidad del coágulo (por su capacidad de absorber agua y disminuir la sinéresis). En el caso de las muestras 2, 10 y 13 (con niveles máximos de dos de los hidrocoloides y el tercero en nivel intermedio) no evidenciaron desuerado. La variación porcentual fue menor al 3% durante la vida útil.

La sinéresis espontánea se produce como resultado del reordenamiento de la matriz y contracción del gel que resulta en la expulsión del suero de leche (Serra, Trujillo & Ferragut, 2009). Con la cuantificación de la retención de agua, por acción de la gravedad, se trató de determinar la estabilidad del coágulo tal cual el producto se presenta a disposición del consumidor en el mercado (en góndola), observando que se produce una sinéresis casi nula, minimizando el riesgo de que se produzca este defecto, lo cual permite concluir que la combinación de hidrocoloides produce un coágulo con muy alta estabilidad, que también se ve favorecida por la adición de concentrado de proteínas de suero (WPC), que tienen la capacidad de retener agua.

Tabla IV.7. IRA% promedio por acción de la gravedad y variación porcentual (V%) para las muestras durante el almacenamiento (3, 17 y 31 días) para el caso de estudio 1.

Exp. Nº	Días			V%
	3	17	31	
1	100	100	100	0
2	100	100	100	0
3	100	99,92	99,59	0,41
4	100	99,98	99,63	0,36
5	100	100	99,85	0,14
6	100	99,75	100	0
7	100	100	97,04	2,96
8	100	100	99,82	0,18
9	100	100	99,69	0,31
10	100	100	100	0
11	100	100	99,88	0,12
12	100	100	100	0
13	100	100	100	0
14	100	99,98	99,64	0,36

Los errores estándares fueron menores al 5%.

IV.2.5.2. Determinación del índice de retención de agua por centrifugación.

Las muestras 6, 8, 9, 10, 11, 12 y 13 no evidenciaron sinéresis ($\% \text{IRA}_c = 100 \%$) durante la primer semana de almacenamiento al ser sometidas bajo la acción centrífuga. Al igual que lo observado en la retención por acción de la gravedad, el experimento 7 presentó la menor capacidad para retener agua en estas condiciones en las diferentes semanas de ensayo (tabla IV.8. y figura IV.7.). De esta manera, se vuelve a destacar la importancia de los hidrocoloides adicionados en la estabilidad del coágulo cuando éste es sometido a un tratamiento mecánico intenso (condiciones aceleradas), como lo es la centrifugación.

Tabla IV.8. IRA% promedio por centrifugación y variación porcentual (V%) de las muestras durante el almacenamiento (3,17 y 31 días) para el caso de estudio 1.

Exp. Nº	Días			V%
	3	17	31	
1	99,52	98,99	88,22	11,35
2	99,98	100	100	0,02
3	99,39	99,35	99,17	0,21
4	99,18	99,53	99,34	0,16
5	99,83	99,97	99,82	0,01
6	100	99,67	99,44	0,56
7	92,82	90,86	90,27	2,75
8	100	99,98	99,52	0,48
9	100	98,63	96,89	3,11
10	100	100	99,77	0,23
11	100	100	98,17	1,83
12	100	99,70	99,66	0,34
13	100	97,37	97,07	2,93
14	99,18	99,53	99,34	0,16

Los errores estándares fueron menores al 5%.

La sinéresis forzada por centrifugación no representa la rotura habitual de la matriz, sino que refleja la capacidad de toda la estructura de gel para retener el agua, de la cuajada rota (Serra, Trujillo y Ferragut, 2009).

Se observa que más del 75 % de las muestras tuvieron IRA % mayor a 99 %, durante el almacenamiento, lo cual representa una excelente estabilidad del coágulo, aún en condiciones mecánicas extremas. Además, la variación porcentual fue en general menor al 3% durante la vida útil.

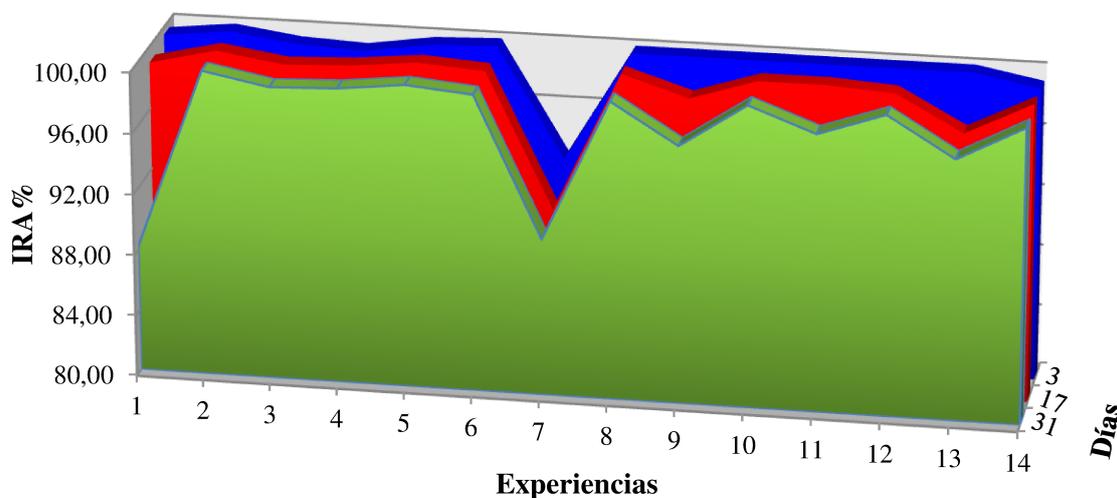


Figura IV.7. Gráfica de IRA% por centrifugación para las diferentes muestras de leches fermentadas en función del almacenamiento (días 3: azul, 17: rojo y 31: verde), para el caso de estudio 1.

IV.2.5.3. Comparación de ambos métodos.

Comparando ambos métodos empleados (por centrifugación y por acción de la gravedad) para la determinación de la retención de agua, el % IRA promedio mensual en condiciones aceleradas (por centrifugación), fue superior al 88 % durante toda la vida útil de las leches fermentadas y, en la mayoría de las experiencias, mayor al 98 %; en cambio, en condiciones estáticas (por acción de la gravedad), similar a lo que ocurre con el producto en góndola, fue siempre superior al 97 % en ese mismo período de tiempo. El aumento de la sinéresis con el almacenamiento se encuentra usualmente asociado con el reordenamiento que sufre la red de caseína lo que promueve la expulsión de suero (Amatayakul y col., 2006). Los hidrocoloides y proteínas de suero (como el WPC35) tienen una elevada capacidad para unir agua y pueden actuar sinérgicamente reteniendo el agua en la estructura del gel (Fizman y col., 1999).

En general, manteniendo dos de los hidrocoloides en concentración máxima en la formulación y el otro en su concentración intermedia, se logra obtener un coágulo muy estable debido a una interacción favorable (sinérgica) entre ambos para evitar la liberación de suero. Como ya se explicó anteriormente, la experiencia 7 (sin G ni GEC, intermedio AMM) presentó la mayor sinéresis (menor % IRA) de todas las muestras

sometidas tanto a centrifugación, como a acción de la gravedad; observándose una caída muy brusca de la retención de agua, al aplicar la fuerza centrífuga, lo cual permite decir que la ausencia de estos estabilizantes desmejora mucho la capacidad de retención de suero. Por ende, la susceptibilidad a la sinéresis está inversamente relacionada a la cantidad de estabilizantes adicionados, por lo tanto la adición de los mismos ayuda en la estabilidad del coágulo, siendo un parámetro de control de calidad relevante, ya que la separación de suero es un defecto indeseable en los productos lácteos.

IV.2.6. RECuento DE MICROORGANISMO PROBIÓTICO.

En la tabla IV.9. y figura IV.8., se muestra el recuento del microorganismo probiótico utilizado (*L. rhamnosus* Sp1), para los distintos experimentos del diseño en función del almacenamiento (3 y 31 días). Al día 3, la muestra 1 tuvo un recuento de 7,61 logUFC.g⁻¹, mientras que en la muestra 5 fue de 8,35 log UFC.g⁻¹, siendo las experiencias de mínimo y máximo recuento. Para el día 31, la muestra 2 tuvo un recuento mínimo de 7,18 logUFC.g⁻¹ mientras que en la experiencia 3 fue de 8,88 logUFC.g⁻¹. De esta manera, puede afirmarse que el conteo de microorganismo probiótico varió en forma aleatoria durante toda la vida útil siendo siempre superior a 7 log UFC.g⁻¹, lo que equivale a 1. 10⁷ UFC.g⁻¹, para todas las leches fermentadas obtenidas, independientemente de su formulación. Por lo tanto, puede decirse que todas las muestras elaboradas garantizan la dosis mínima de microorganismo probiótico requerida en el alimento antes de ser consumido (IDF, 1992; Charteris y col., 1998).

La variación porcentual (V%) entre fin e inicio de vida útil siempre fue menor al 10% (tabla IV.8.) y generalmente se observó una disminución en el recuento hacia el final del almacenamiento de las muestras. Aún así, la variación general nunca fue superior a la de 1 orden logarítmico, garantizando una dosis casi constante durante la vida de anaquel.

Como la tendencia general, es la disminución del recuento de microorganismos viables con el transcurso del tiempo de almacenamiento; esto remarca la importancia de obtener recuentos elevados, al poco tiempo de elaboradas las leches fermentadas probióticas, para asegurar que durante el resto de la vida útil, y al momento de llegar al consumidor, la viabilidad de los microorganismos probióticos se mantenga dentro de los valores requeridos (1.10⁶ - 1.10⁷ UFC.g⁻¹). Esta disminución, estaría relacionada con el descenso del pH y la acumulación de ácido láctico, como resultado de la actividad

residual de las bacterias iniciadoras (Shah, 2000). De esta manera, la mayor acidez desarrollada estaría influenciando la sobrevivencia del microorganismo probiótico aunque en forma controlada, posiblemente a que la matriz alimenticia posee diversos factores de supervivencia y crecimiento, propios y también generados por los tratamientos térmicos (ácido fórmico, lactulosa y aminoácidos libres, entre otros).

Los hidrocoloides (independientemente del porcentaje en el que se hallan en la matriz alimentaria) no interfieren en la viabilidad del microorganismo probiótico.

Tabla IV.9. Recuento de *Lactobacillus rhamnosus* Sp1 (logUFC.g⁻¹) y variación porcentual (V%) durante el almacenamiento para las muestras de leches fermentadas probióticas con colesterol reducido, para el caso de estudio 1.

Exp. N°	Días		V%
	3	31	
1	7,61	7,60	0,04
2	7,79	7,18	7,80
3	8,16	8,88	8,71
4	8,00	7,33	8,39
5	8,35	8,36	0,08
6	7,74	8,12	4,94
7	7,79	7,49	3,78
8	7,92	8,05	1,55
9	8,05	7,54	6,34
10	8,26	7,93	3,96
11	7,97	7,92	0,68
12	7,74	8,22	6,15
13	8,07	7,96	1,26
14	8,00	7,33	8,39

Los errores estándares fueron menores al 5%.

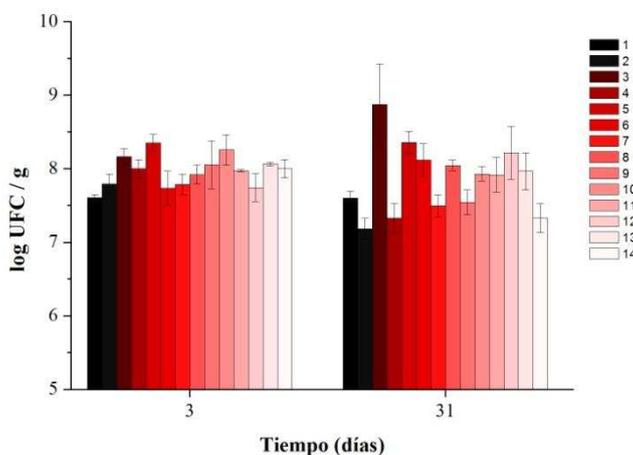


Figura IV.8. Gráfica del Log UFC.g⁻¹ de *L. rhamnosus* Sp1 vs. tiempo (3 y 31 días) para las diferentes muestras correspondientes al caso de estudio 1.

Estos resultados son comparables con otros estudios realizados en yogures (Cruz y col., 2012) y otros productos lácteos como quesos frescos (Gomes y col., 2011) y postres deshidratados (Trujillo-de Santiago y col., 2012). Sin embargo, en estos últimos dos productos, los recuentos de probióticos fueron significativamente reducidos por operaciones industriales como el drenaje de suero y procesos de secado, respectivamente, lo cual incrementa los costos de producción, debido a que debe adicionarse más inóculo por las pérdidas. Adicionalmente, el número de bacteria probiótica por porción es mayor en el caso de los yogures y resulta además de mayor comodidad su ingesta (Gomes y col., 2011). Esto refuerza el hecho que los yogures y leches fermentadas siguen siendo los vehículos más populares para el delivery de microorganismos probióticos.

IV.2.7. ANÁLISIS DE LA REOMETRÍA DESTRUCTIVA CON VISCOSÍMETRO DE CILINDROS CONCÉNTRICOS.

IV.2.7.1. Reogramas esfuerzo de corte (τ) en función del gradiente de deformación ($\dot{\gamma}$).

En la tabla IV.10. se resumen los valores promedios de: *índice de consistencia superior* (K_s) e *inferior* (K_i), el *índice de comportamiento superior* (n_s) e *inferior* (n_i) e *índice de tixotropía* (IT) durante la vida útil de los productos (a los 3 y 31 días) para las diferentes muestras comprendidas en el caso de estudio 1.

Por otra parte, de la tabla IV.10, se observa que en general las leches fermentadas elaboradas pudieron caracterizarse como fluidos *No-Newtonianos* (valores de índice de comportamiento $n < 1$); esto significa que no existe proporcionalidad constante entre el esfuerzo de corte (τ) y el gradiente de deformación ($\dot{\gamma}$) y, por ende, la viscosidad depende del $\dot{\gamma}$ a la que se evalúe.

Además, la mayoría de los valores de n se encuentran entre 0,3 y 0,7, algo menores a otras leches fermentadas (como el yogur), donde suelen ser superiores a 0,6 (Rozycki y Seguro, 1995). Esto se debe a que los estabilizantes suelen generar un comportamiento más No Newtoniano (FNN), representado por la mayor lejanía al valor $n = 1$, correspondiente a un Fluido Newtoniano (FN).

Tabla IV.10. Valores promedios estimados de los parámetros reológicos: K superior (K_s), K inferior (K_i), n superior (n_s) y n inferior (n_i), viscosidad aparente (μ_{ap50} , medida a gradiente de deformación de 50 s^{-1}), índice de tixotropía (IT) y variación porcentual ($V\%$) de cada uno, para los diferentes reogramas obtenidos a partir de las experiencias del caso de estudio 1 a los 3 y 31 días de almacenamiento. ^a: curva ascendente; ^b: curva descendente; R^2 : coeficiente de determinación obtenido de la modelo de Herschel y Bulckey. [K] = $\text{Pa}\cdot\text{s}^n$; [n] = adimensional; [IT] = $\text{Pa}\cdot\text{s}^{-1}$, [μ_{ap50}] = $\text{mPa}\cdot\text{s}$. (Los errores estándares fueron menores al 5%).

Día	Parámetros	Experiencia N°													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
3	K_s^a	1,877	2,125	1,131	0,904	2,068	1,253	0,709	0,968	2,643	1,929	1,855	1,736	3,07	1,893
	n_s^a	0,541	0,476	0,59	0,535	0,506	0,486	0,482	0,493	0,446	0,672	0,682	0,655	0,528	0,535
	R^2	0,983	0,981	0,969	0,988	0,964	0,937	0,969	0,955	0,922	0,983	0,985	0,991	0,985	0,989
31	K_s^a	2,122	2,367	1,179	0,961	2,201	1,341	1,203	1,013	2,638	2,157	1,948	2,019	3,284	2,251
	n_s^a	0,473	0,416	0,578	0,643	0,527	0,501	0,425	0,424	0,345	0,647	0,616	0,641	0,335	0,541
	R^2	0,953	0,557	0,991	0,997	0,929	0,961	0,894	0,895	0,942	0,988	0,993	0,992	0,976	0,962
V%	K_s	13,05	11,39	4,24	6,31	6,43	7,02	69,68	4,65	0,19	11,82	5,01	16,30	6,97	18,9
	n_s	12,57	12,61	2,03	20,19	4,15	3,09	11,83	14,00	22,65	3,72	9,68	2,14	36,55	1,12
3	K_i^b	0,625	1,435	0,573	0,177	0,893	0,318	0,388	0,294	1,3	0,852	0,79	0,542	2,314	0,59
	n_i^b	0,751	0,753	0,771	1,052	0,809	0,891	0,785	0,814	0,774	0,874	0,873	0,937	0,732	0,735
	R^2	0,998	0,993	0,997	0,978	0,998	0,998	0,994	0,973	0,997	0,968	0,981	0,968	0,978	0,998
31	K_i^b	0,797	1,898	1,058	0,15	1,116	0,376	0,591	0,371	2,23	1,036	0,741	0,728	2,787	0,761
	n_i^b	0,758	0,71	0,696	1,026	0,789	0,866	0,667	0,811	0,627	0,841	0,707	0,89	0,742	0,762
	R^2	0,998	0,999	0,993	0,997	0,994	0,997	0,995	0,995	0,997	0,975	0,994	0,979	0,948	0,991
V%	K_i	27,52	32,26	84,64	15,25	24,97	18,24	52,32	26,19	71,54	21,60	6,20	34,32	20,44	28,9
	n_i	0,932	5,71	9,73	2,47	2,47	2,81	15,03	0,37	18,99	3,78	19,01	5,02	1,37	3,67
3	μ_{ap50}	449,5	1574,3	441,6	352,8	1252,2	682,1	306,4	372,5	1145,6	1075,6	559,1	953,4	2855,1	714,3
31		481,31	2048,7	522,2	366,6	1544,8	644,7	488,8	481,1	1451,5	1144,2	898,3	1005,7	3010,5	732,2
V%		7,1	30,13	18,25	3,91	23,37	5,48	59,53	29,21	26,70	6,38	60,67	5,49	5,44	2,51
3	IT	1778,9	5710,1	1044	1163,6	5114,4	2299,3	1066,6	1079,9	4750,6	2128,4	1060,2	2447,6	6851,1	1874,3
31		1915,3	8412,9	647,2	1455,3	6328,9	2381,9	1330,2	1721,4	5746,3	1990,5	1631,3	2531,4	7481,6	2020,4
V%		7,72	47,33	38,01	25,07	23,75	3,59	24,71	59,40	20,96	6,48	53,87	3,42	9,20	7,79

IV.2.7.1.1. *Análisis de las curvas de flujo superiores (gradientes de deformación crecientes).*

A los 3 días posteriores a la elaboración el valor de K_s varió entre 0,709 Pa.sⁿ (exp. 7: sin G, ni GEC, intermedio AMM) y 3,070 Pa.sⁿ (exp. 13, máxima cantidad de G y GEC, intermedio AMM).

La regresión múltiple entre los valores de $K_{s\text{día}3}$, con las variables codificadas, dio como resultado un modelo predictivo (tabla IV.11.) altamente significativo ($p < 0,0001$), que ajustó muy adecuadamente con los datos experimentales (R^2 y R^2 -ajustado $> 0,94$) y la falta de ajuste fue no significativa ($p > 0,05$).

Analizando los términos lineales se puede observar que K_s estuvo influenciado directamente por G (X_1) y GEC (X_3), siendo el término X_1 más significativo, y con coeficiente aproximadamente dos veces mayor respecto a X_3 , lo cual permite decir que la gelatina influye aproximadamente el doble que la espina corona, en los valores de K_s .

La influencia de AMM (X_2) no fue significativa sobre dicha respuesta, sin embargo este término se introdujo en el modelo ya que el término cuadrático (X_2^2) resultó significativo y de esta manera se conservó la jerarquía del modelo. La interacción entre G y GEC ($X_1.X_3$) también resultó significativa.

En la figura IV.9., a través de la metodología de superficie de respuesta, se muestra la variación del índice de consistencia, $K_{s\text{día}3}$, respecto a la concentración de G y GEC, manteniendo en su valor medio el nivel de AMM. Así mismo, se evidencia la influencia de las variables del diseño sobre este mismo parámetro por medio de líneas de contorno.

Estas gráficas permiten confirmar que los valores mayores de K_s se obtienen con mayores concentraciones de G (principalmente) y de GEC; en cambio, los valores más bajos de K_s se logran a las mínimas concentraciones de ambos hidrocoloides. Esto significa que al aumentar la concentración de ambos hidrocoloides, se genera un producto con mayor consistencia y mayor viscosidad, con una estructura más firme ($> K$).

A través del análisis de las líneas de contorno (figura IV.9. b) se puede señalar que al comparar las variaciones de G y GEC sobre el aumento de K_s , se requiere una menor variación (menor aumento) de G, respecto a GEC, para obtener un mismo valor de K_s .

Tabla IV.11. Coeficientes de regresión del modelo polinomial de segundo orden para K_s , n_s , K_i , n_i , μ_{ap50} e IT (utilizando las variables del diseño codificadas) y estadísticos obtenidos a partir del análisis ANOVA de cada modelo, para el día 3 y 31 de almacenamiento de las leches fermentadas probióticas con colesterol reducido obtenidas para el caso de estudio 1.

Factores	Día 3					Día 31			
	K_s	n_s	K_i	μ_{ap50}	IT	K_s	n_s	μ_{ap50}	IT
C	2,01	0,54	0,74	532,9	1934,56	2,24	0,46	554,9	2125,8
X_1	0,66***	-0,042***	0,50***	645,9***	2261,47***	0,65***	-0,08**	722,5***	2863,2**
X_2	0,095	0,004	0,16		172,03	0,11	-0,012	120,2*	150,2
X_3	0,33**	0,079***	0,27**	367,1**	411,36**	0,40***	0,068**	374,06***	
$X_1 \cdot X_2$		-0,021*							723,1*
$X_1 \cdot X_3$	-0,18*	-0,030**		364,2*	523,72**		-0,05*	287,4*	
$X_2 \cdot X_3$					-384,64*				
$(X_1)^2$		-0,027***	0,40*	396,7*	1410,50***			591,5***	2003,4***
$(X_2)^2$	-0,49***	0,015*	-0,30*			-0,59***			
$(X_3)^2$		0,023**		262,4*			0,091**	289,89*	
Estadísticos									
R^2	0,9663	0,9866	0,9067	0,9284	0,9914	0,9881	0,8320	0,9697	0,9659
R^2 -ajust.	0,9452	0,9651	0,8485	0,8836	0,9840	0,9829	0,7284	0,9437	0,9507
valor-F	45,86	45,92	15,56	20,73	134,20	187,53	7,97	37,3	63,7
Falta de ajuste (p-valor)	0,0517	0,1983	0,0798	0,5323	0,1905	0,6662	0,5676	0,6445	0,0956

Significancia: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

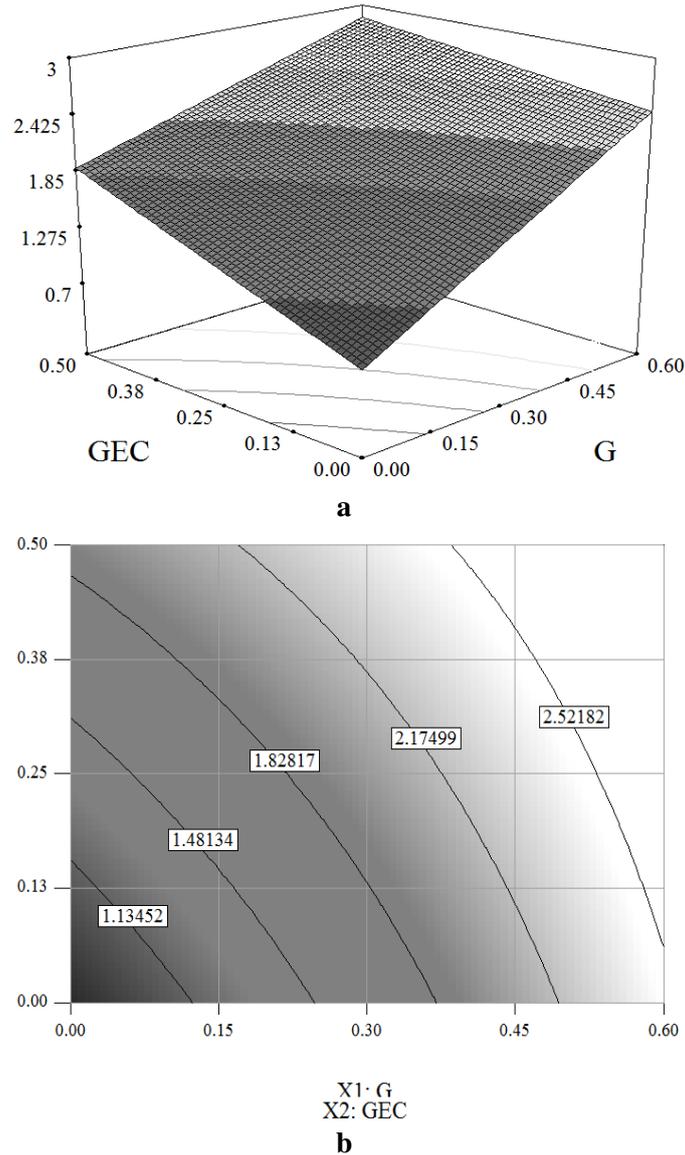


Figura IV.9. Gráficas de superficie de respuesta (a) y líneas de contorno (b) para $K_{s\text{dia}3}$ en función de la concentración de G y GEC, manteniendo constante AMM y en su nivel intermedio, para el caso de estudio 1.

El efecto de interacción entre G y GEC sobre $K_{s\text{dia}3}$ se puede observar en la figura IV.10. Allí se puede ver que a bajas concentraciones de GEC, el aumento de consistencia requirió mayores incrementos en la concentración de G en comparación con el caso de utilizar concentraciones elevadas de GEC.

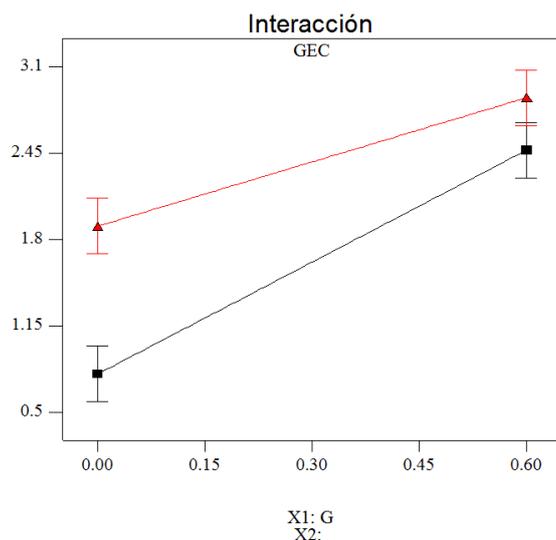


Figura IV.10. Efecto de interacción entre factores X_1 , X_3 (correspondientes a G y GEC, respectivamente) sobre $K_{s\text{ dia }3}$, manteniendo constante AMM en su valor intermedio, para el caso de estudio 1. Negro: 0% GEC; rojo: 0,5% GEC.

A los 31 días de vida útil, $K_{s\text{ dia }31}$ varió entre 0,961 Pa.sⁿ (muestra 4: sin G ni AMM, intermedio GEC) y 3,284 Pa.sⁿ (muestra 13: máximo G y GEC e intermedio AMM).

A su vez, se observó la misma dependencia con respecto a las variables de los términos lineales que para el día 3 (tabla IV.11.), con excepción de la participación significativa del AMM. Las interacciones entre las duplas de las variables fueron no significativas. El término cuadrático (X_2^2) resultó negativo y significativo para el modelo de predicción. Esto último puede observarse en la curvatura “hacia abajo” de gráfica de superficie de respuesta de $K_{s\text{ dia }31}$ en función de G y AMM, manteniendo GEC en su nivel intermedio y constante. En este caso los mayores valores de $K_{s\text{ dia }31}$ se obtienen en concentraciones intermedias de AMM y máximas de G (figura IV.11.).

Durante el almacenamiento, K_s generalmente aumenta (tabla IV.10.), siendo las variaciones porcentuales (V%) por lo general menores al 20%, con excepción de la muestra 7 (cerca al 70%). La presencia de G y GEC genera productos más estables en el almacenamiento. Los aumentos de K_s se condicen con un aumento de la consistencia y viscosidad por generación de enlaces, principalmente no covalentes, que generan una matriz más firme, impartiendo ambos hidrocoloides una buena estabilidad en las leches fermentadas obtenidas y aumentando, además, la tixotropía durante este período.

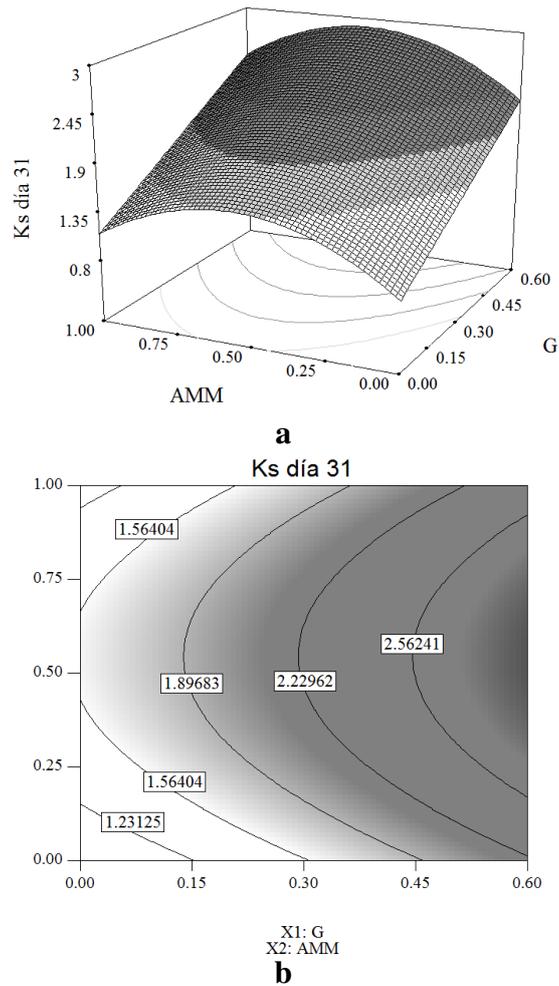


Figura IV.11. Gráficas de superficie de respuesta (a) y líneas de contorno (b) para K_s dia 31 en función de la concentración de G y AMM, manteniendo constante GEC y en su nivel intermedio, para el caso de estudio 1.

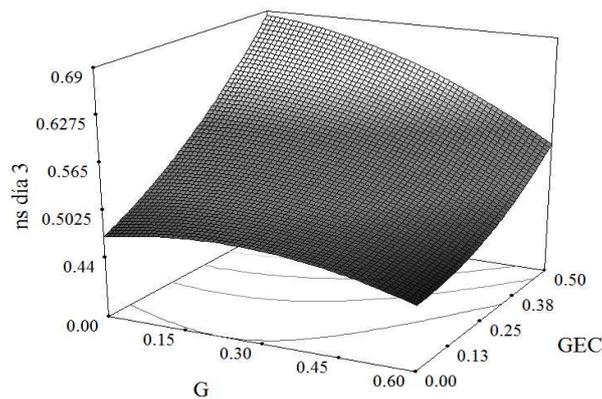
De esta manera, se lograron obtener leches fermentadas similares a las del mercado, de diferentes consistencias: bebibles (consistencia líquida), batida (consistencia intermedia) y firme o “set” (con mayor consistencia).

Por su parte, el mayor valor de $n_{s\text{día}3}$ que se obtuvo fue de 0,682 (experiencia 11, sin G, intermedio AMM y máxima proporción de GEC) y el menor valor fue de 0,446 (que corresponde al experimento 9, donde la concentración de G es máxima y la de GEC nula, intermedio de AMM) para los 3 días de vida útil (tabla IV.10). Esto demuestra la participación principalmente de G para que el fluido se aleje del comportamiento newtoniano ($n = 1$).

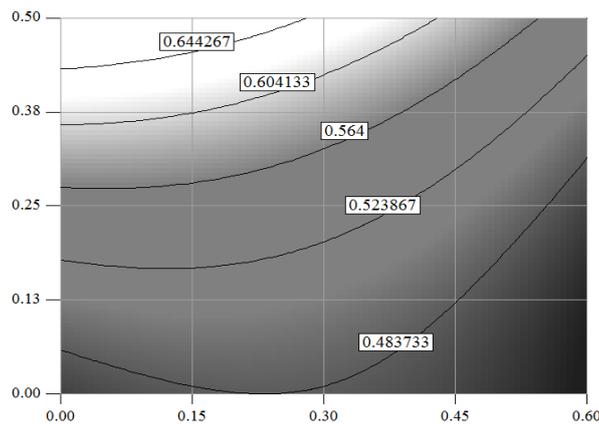
La regresión múltiple de $n_{s\text{día}3}$ con las variables del diseño codificadas, permitió obtener el modelo simplificado significativo ($p < 0,0001$), cuyos coeficientes se detallan en la tabla IV.11. La falta de ajuste fue no significativa, R^2 y R^2 -ajustado muy

adecuados ($> 0,90$). Analizando la influencia de las variables, se puede observar que los términos lineales altamente significativos ($p < 0,001$) son los correspondientes a G (X_1) y GEC (X_3), siendo la influencia de AMM (X_2) no significativa, sin embargo se introdujo este término en el modelo para mantener la jerarquía y el modelo sea más armonioso. Los términos de las interacciones ($X_1.X_2$) y ($X_1.X_3$) son significativos. Esto indica que el efecto de la concentración de G sobre $n_{s\text{día}3}$ es diferente para los distintos niveles de concentraciones de AMM y GEC. Los términos cuadráticos de las 3 variables también resultaron significativos.

A través de los gráficos de superficie de respuesta y líneas de contorno (figura IV.12.) se puede observar como n_s depende de manera inversa de G y directamente de GEC, donde los valores más bajos de n_s , y por lo tanto un mayor alejamiento al comportamiento de un fluido Newtoniano, se obtiene a bajas concentraciones de GEC y a mayores porcentajes de G.



a



X1: G
X2: GEC

b

Figura IV.12. Gráficas de superficie de respuesta (a) y líneas de contorno (b) para $n_{s\text{día}3}$ en función de la concentración de G y de GEC, manteniendo constante AMM y en su nivel intermedio, para el caso de estudio 1.

Los valores de $n_{sdía31}$ variaron entre 0,335 (muestra 13) y 0,647 (muestra 10) (tabla IV.10.). Puede señalarse una disminución del valor de n_s (de todas las experiencias) con el tiempo de almacenamiento, es decir, las leches fermentadas elaboradas se alejan levemente, cada vez más, del comportamiento Newtoniano con el transcurrir del tiempo de almacenamiento.

Las variaciones porcentuales en general fueron menores al 20% durante la vida útil.

El modelo matemático encontrado para $n_{sdía31}$ fue similar que para $n_{sdía3}$, en cuanto a que la influencia de los términos lineales siguió el mismo comportamiento que para el día 3 (tabla IV.11).

IV.2.7.1.2. Análisis de las curvas de flujo inferiores (gradientes de deformación decrecientes).

El análisis de la curva inferior se correlaciona con un tratamiento mecánico más energético que el correspondiente a la curva superior, ya que el producto se encuentra cizallándose más tiempo, y como tiene comportamiento tixotrópico su viscosidad decae al aumentar este tiempo. La presencia de hidrocoloides atenúa este efecto, sin eliminarlo.

El mayor valor de $K_{idía3}$ que se obtuvo fue de 2,314 Pa.sⁿ (que corresponde al experimento 13, con máxima proporción de G y GEC, intermedio AMM) y el menor valor fue de 0,177 Pa.sⁿ (correspondiente al experimento 4, con nula concentración de G y AMM e intermedia de GEC) (tabla IV.10.).

Por regresión múltiple, se pudo encontrar un modelo predictivo significativo y adecuado para explicar la relación entre el índice de consistencia inferior, $K_{idía3}$, respecto de las variables de diseño codificadas (tabla IV.11.).

Analizando los términos lineales, se puede señalar que los 2 hidrocoloides afectan directamente el valor de $K_{idía3}$, siendo el término de G (X_1) de mayor significancia que el de GEC (X_3). La gelatina posee un efecto mayor (coeficiente aproximadamente dos veces más grande que el de GEC). El término correspondiente a AMM (X_2) no resultó significativo, sin embargo se lo introdujo en el modelo para mantener la jerarquía debido a que X_2^2 sí resultó significativo. El término cuadrático de G (X_1^2) también resultó significativo y positivo, es por ello la curvatura de la gráfica de superficie de respuesta “hacia arriba” (figura IV.13.). El aumento de las concentraciones de G (principalmente) y GEC produce un aumento de la respuesta.

Los valores de $K_{idía31}$ variaron desde 0,15 Pa.sⁿ (muestra 4) a 2,787 2,314 Pa.sⁿ (muestra 13) (tabla IV.10). Si bien se observó la misma tendencia de aumento de este parámetro conforme al aumento de espesantes, no se pudo hallar un modelo matemático significativo que pueda explicar el comportamiento de la respuesta con respecto a las variables de estudio.

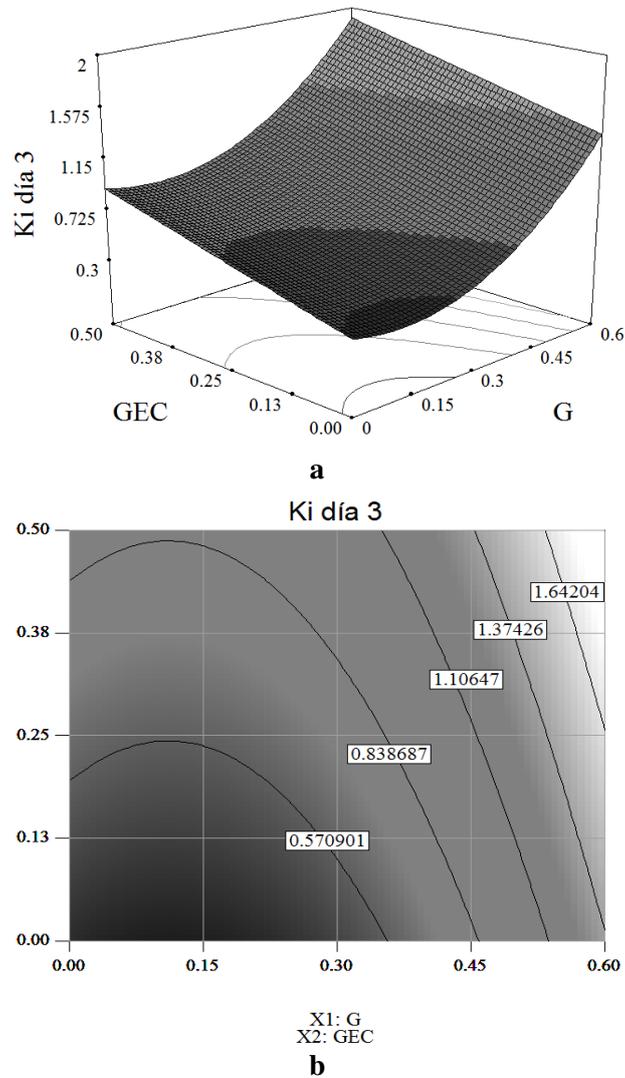


Figura IV.13. Gráficas de superficie de respuesta (a) y líneas de contorno (b) para $K_{idía3}$, en función de la concentración de G y GEC, manteniendo constante AMM y en su nivel intermedio, para el caso de estudio 1.

Para el caso de $n_{idía3}$ los valores variaron entre 0,732 (muestra 13) y 1,052 (muestra 4) y para $n_{idía31}$ el rango fue entre 0,627 (muestra 9) y 1,026 (muestra 4) (tabla IV.10). Para el caso de la muestra 4 podemos decir que la misma tuvo un comportamiento similar al Newtoniano ($n = 1$). Al igual que lo ocurrido para $K_{idía31}$ no se pudieron encontrar modelos matemáticos que ajusten adecuadamente a los datos experimentales

posiblemente debido al mayor tratamiento mecánico sufrido por el producto en esta instancia del ensayo que minimiza el efecto de hidrocoloides.

En términos generales, tanto K_s (curva superior) como K_i (curva inferior) presentaron un comportamiento similar al mostrar una dependencia directa de las variables G y GEC en ambos períodos de ensayo. Sin embargo, como la acción de cizalla es más intensa para K_i (se corresponde con un mayor tiempo de cizallamiento), es lógico ver que en esta parte de la curva, el producto recibió un mayor tratamiento mecánico y por ende resulta menor el valor de este parámetro (y el de la viscosidad) comparado con el de K_s .

Por otro lado, en la tabla IV.10. se aprecia que los valores de n_s son menores que los de n_i , en ambos tiempos de ensayo, lo que se debe al mayor tratamiento mecánico que tienen las muestras al calcular n_i , por lo que el alimento se fluidifica (pierde consistencia y viscosidad) y se aproxima más al comportamiento newtoniano (n_i más cercano al valor 1).

A modo de resumen, en las curvas descendentes (a gradientes de deformación decreciente) se evidencia la alteración (disrupción) de la red proteica que conforma el gel de las leches fermentadas. Se debe tener en cuenta este cambio en la firmeza y viscosidad de los productos luego de un tratamiento mecánico prolongado (como ocurre durante el transporte por cañerías, bombeo, agitación, etc.) para que el gel conserve la estructura deseada en el producto final, ya envasado.

Por otro lado, la adición de espesantes/estabilizantes aumenta significativamente las propiedades tixotrópicas de las leches fermentadas.

La gelatina, principalmente, interacciona con las caseínas a través de la formación de puentes que generan una red continua y bastante homogénea, lo que refuerza la firmeza (que se observa en los mayores valores de consistencia). A su vez, esta red más interconectada retendría la fase acuosa más eficientemente, reduciendo el drenaje del suero (Fizman y col., 1999).

Por su parte, la similitud de la GEC con goma guar, hace pensar que la GEC, en altas concentraciones, actuaría como la goma guar incrementando la consistencia y viscosidad de la fase continua que contienen agregados micelares compactos y formando una red polimérica (Everett & McLeod, 2005). GEC probablemente actuaría como relleno entre la red de proteínas lácteas, estableciendo interacciones no electrostáticas, ya que es un polisacárido neutro (Spotti y col., 2012).

En comparación con GEC y G, el AMM no tuvo una influencia significativa sobre la consistencia de las leches fermentadas aquí obtenidas. Sin embargo, diversos estudios como los de Oroian y col. (2011) han demostrado que el almidón adicionado sólo, mejoró las propiedades reológicas de yogures.

Por otro lado, de acuerdo con Tamime y Robinson (2000), un cambio físico típico de los yogures durante el almacenamiento en condiciones refrigeradas, es el aumento de la viscosidad y consistencia como consecuencia de la hidratación de las moléculas y los estabilizantes adicionados. Esto permite explicar el aumento de la consistencia (K) y la disminución del índice de comportamiento (n) durante el almacenamiento.

IV.2.7.1.3. Análisis de la viscosidad aparente a gradiente de deformación 50 s^{-1} .

La detección de la viscosidad que tiene un alimento al ser masticado en la boca es un proceso complejo y dinámico (Van Vliet, 2002). Algunos autores han sugerido que la medición de la viscosidad a una velocidad de cizallamiento de 50 s^{-1} representa la velocidad de cizallamiento en la boca (Wood, 1986; Marcotte, Taherian Hoshahili & Ramaswamy, 2001; Bourne, 2002).

A partir de la tabla IV.10. se puede observar que la viscosidad aparente a gradiente 50 s^{-1} (μ_{ap50}) varió entre 306,4 mPa.s (muestra 7) y 2855,1 mPa.s (muestra 13) al día 3 de almacenamiento, mientras que para el día 31 el rango de variación fue de 366,6 mPa.s (muestra 4) y 3010,5 mPa.s (muestra 13). Como puede observarse las muestras sin 2 de los hidrocoloides y el otro en su concentración intermedia son aquellas que tuvieron la viscosidad aparente más baja, lo que era de esperarse debido a la menor firmeza que también presentaron las mismas. Caso contrario se obtuvo para las muestras con mayor contenido de G (principalmente) y GEC. Después del almacenamiento en frío las viscosidades aparentes aumentaron, y la mayor variación porcentual de este parámetro entre fin e inicio de vida útil se dio en la muestra con menor concentración de G y GEC (experiencia 7, siendo de 60% aproximadamente).

Con los datos experimentales y las variables codificadas, se obtuvieron los modelos matemáticos significativos ($p < 0,0001$) para ambos períodos de ensayo (tabla IV.11). Los test F para las faltas de ajuste de los dos modelos no son significativos ($p > 0,05$), y a través de los valores de los coeficientes de determinación (R^2) se puede observar que el modelo para $\mu_{ap50\text{día}3}$ explica el 92,84% de la variabilidad de los datos y el modelos para $\mu_{ap50\text{día}31}$ explica el 96,97%. Si miramos los R^2 -ajustados que tienen en cuenta los

términos del modelo simplificado los mismos también fueron superiores a 70%, por lo que son adecuados.

En ambos períodos de estudio el término lineal correspondiente a (X_1) fue el más significativo dentro de los términos lineales. Por otro lado, la interacción $X_1.X_3$ y los términos cuadráticos X_1^2 y X_3^2 también resultaron significativos. La diferencia en los modelos fue que en el caso del día 3, el término de AMM (X_2) no resultó significativo, pero sí para el día 31, lo cual indicaría que durante el almacenamiento el AMM participó de la construcción de la red tridimensional que forma el coágulo.

Las gráficas de superficie de respuesta y líneas de contorno (figura IV.14.) muestran la dependencia positiva de la $\mu_{ap50día3}$ con G y GEG, siendo la gelatina el factor que más influye para la viscosidad a un gradiente similar al de la boca, por lo tanto los valores máximos de $\mu_{ap50día3}$ se observan cuando G y GEC aumentan su concentración, en el rango estudiado.

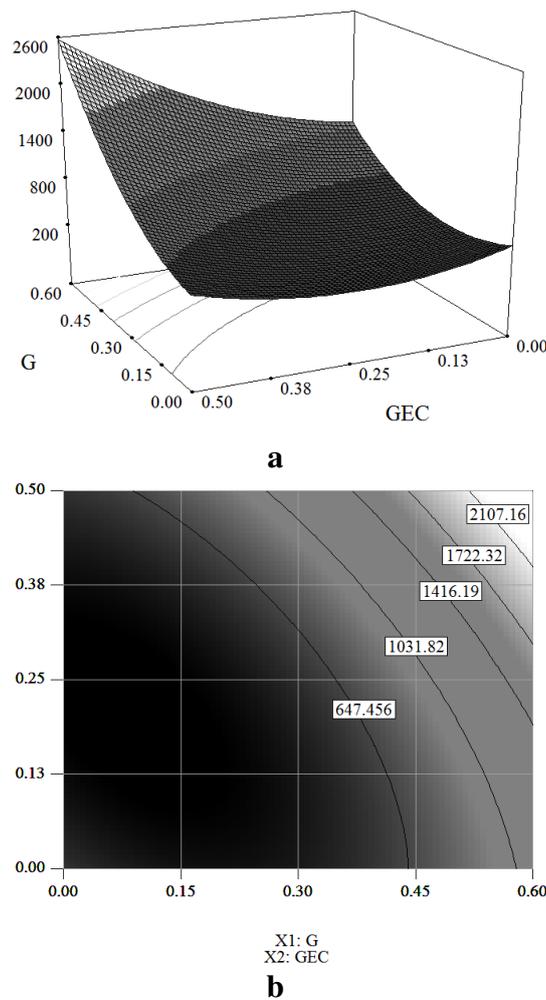


Figura IV.14. Gráficas de superficie de respuesta (a) y líneas de contorno (b) para $\mu_{ap50día3}$, en función de la concentración de G y GEC, manteniendo constante AMM y en su nivel intermedio, para el caso de estudio 1.

El valor de la viscosidad a un gradiente de deformación de 50 s^{-1} se lo conoce comúnmente como viscosidad de Kokini, y representa la velocidad de cizallamiento que se detecta en la boca para alimentos de baja viscosidad (Akhar, Murray & Dickinson, 2006), y se traduciría a lo que aprecia el consumidor sensorialmente mientras lo tiene en la boca (mouthfeel); esto determinaría una característica muy importante que influye directamente en la apreciación de diferentes consistencias y viscosidades en el producto, lo que estaría íntimamente relacionado con la aceptabilidad del mismo.

IV.2.7.2. Análisis del índice de tixotropía.

El índice de tixotropía (*IT*) fue determinado como el área encerrada entre las curvas de flujo ascendente y descendente (área de histéresis). Esta área es una medida de la extensión de la ruptura estructural en la muestra y es un índice de la energía por unidad de tiempo y unidad de volumen necesaria para eliminar la influencia del tiempo en el comportamiento de flujo (Halmos & Tiu, 1981; Rozycki & Seguro, 1995). Como un ejemplo ilustrativo, las gráficas de esfuerzo de corte (τ) en función del gradiente de deformación ($\dot{\gamma}$) para las muestras 7 y 13 a los 3 y 31 días de almacenamiento se representa en la figura IV.15. El área encerrada entre las curvas de flujo fue mayor (mayor *IT*) para la muestra 13 y aquellas experiencias elaboradas con máxima cantidad de 2 hidrocoloides, (principalmente gelatina), aumentando en promedio 6 veces el área de la muestra 13, comparada con la muestra 7 (tabla IV.10 y figura IV.15.).

Esto indica que las leches fermentadas con un alto contenido de hidrocoloides (como es en el caso de la muestra 13) poseen un elevado número de enlaces principalmente no covalentes, responsables de la tixotropía (Rozycki y Seguro, 1995), que son más susceptibles a la ruptura estructural debido a la aplicación de un esfuerzo cortante; esto debe ser tenido en cuenta en el caso de agitación, bombeo y transporte en cañerías durante los procesos industriales.

Durante el período de almacenamiento (un mes), los productos presentaron un comportamiento que caracteriza a los fluidos no newtonianos, mostrando a su vez ser dependientes del tiempo de cizallamiento o tixotrópicos; su viscosidad disminuye continuamente con el gradiente de deformación y el tiempo de cizallamiento (acción mecánica), lo que sugiere la formación de las interacciones de tipo no covalentes mencionadas, durante la vida de anaquel, debido a la interacción de los hidrocoloides con otros componentes de la matriz.

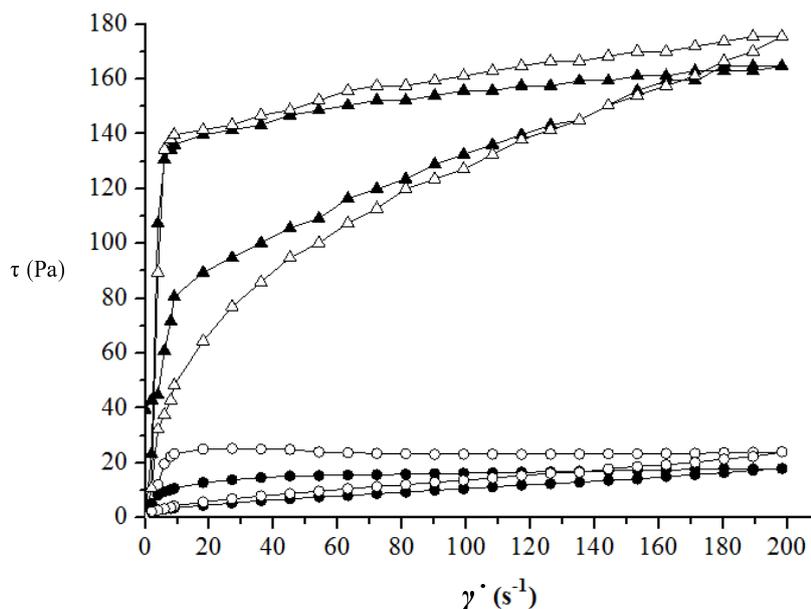


Figura IV.15. Reogramas de esfuerzo de corte (τ [Pa]) en función del gradiente de deformación (γ' [s^{-1}]) para el caso de estudio 1. (●): muestra 7 día 3; (○): muestra 7 día 31; (▲): muestra 13 día 3; (△): muestra 13 día 31.

El valor de IT_{dia3} máximo fue $6851,1 \text{ Pa}\cdot\text{s}^{-1}$ y correspondió al experimento 13 (que corresponde a las concentraciones máximas G y GEC, AMM intermedio); el valor mínimo fue $1044 \text{ Pa}\cdot\text{s}^{-1}$, correspondiente a la muestra 3 (sin G, máximo AMM e intermedio GEC) (tabla IV.10.).

El modelo de predicción hallado para IT_{dia3} fue significativo ($p < 0,0001$) y muy adecuado ($R^2 > 0,95$). La falta de ajuste fue no significativa ($p > 0,05$). La significancia de los términos lineales aumentó en el orden $X_2 < X_3 < X_1$, es decir que la gelatina es la que mayor influencia tiene sobre esta respuesta. Las interacciones $X_1.X_3$ y $X_2.X_3$ y el término cuadrático X_1^2 resultaron significativos (tabla IV.11.).

En la figura IV.16. se puede observar la fuerte dependencia del IT_{dia3} con respecto a la G, siendo que el aumento de este hidrocoloide aumenta significativamente el valor de este parámetro. Por lo tanto, el mayor contenido de G favorece la formación de enlaces del tipo no covalentes (como interacciones hidrofóbicas, fuerzas de van der Waals, puentes de hidrógeno) que promueven la tixotropía (Barnes, 1997). Se observa que para alcanzar valores elevados de IT , se requiere una mínima variación de la concentración de gelatina (si nos desplazamos por el gráfico horizontalmente), cuando ésta es mayor a 0,3 - 0,4 % p/p. En cambio, la variación de concentración de GEC debe ser mucho

mayor (si nos desplazamos por el gráfico verticalmente), para alcanzar los mismos valores de IT .

Resultados similares se obtuvieron a los 31 días de almacenamiento, variando el IT_{dia31} desde $647,2 \text{ Pa}\cdot\text{s}^{-1}$ (muestra 3: mínimo G, máximo AMM, intermedio GEC) a $8412,9 \text{ Pa}\cdot\text{s}^{-1}$ (muestra 2: máximo G y AMM, intermedio GEC), observándose un aumento en la respuesta analizada (tabla IV.10). Las variaciones porcentuales de este parámetro en el almacenamiento fueron variables entre las diferentes muestras.

El almacenamiento provocó que la G sea el único factor significativo dentro de los términos lineales, acentuando de esta manera su influencia directa sobre IT (tabla IV.11).

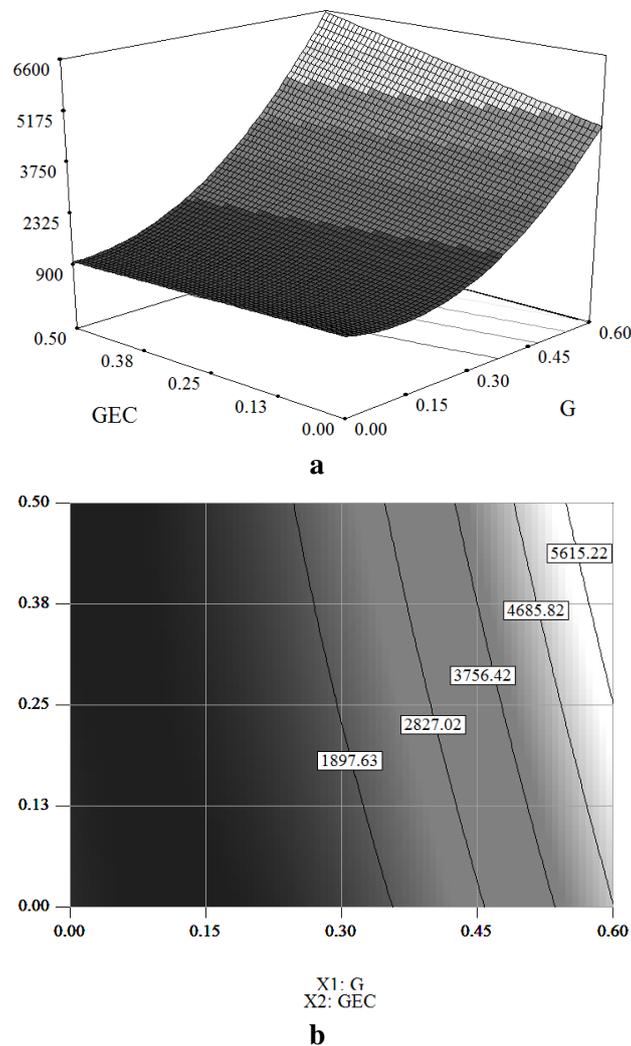


Figura IV.16. Gráficas de superficie de respuesta (a) y líneas de contorno (b) para IT_{dia3} en función de la concentración de G y GEC, manteniendo constante AMM y en su valor intermedio, para el caso de estudio 1.

IV.2.7.4. Variación del esfuerzo de corte en función del tiempo de cizallamiento.

Los parámetros tixotrópicos, A y B , se calcularon por linealización del modelo de Weltmann (ec. 7), que ajustó adecuadamente los valores experimentales (generalmente $R^2 > 0,90$) a partir de los reogramas esfuerzo de corte (τ) vs. tiempo de cizallamiento (t) a un gradiente de deformación constante e igual a 50 s^{-1} (tabla IV.12.). Los valores de A se determinaron de las ordenadas al origen, y los de B de las pendientes de las rectas.

El parámetro A representa la resistencia inicial del producto a deformarse ante una acción mecánica, y el parámetro B mide la velocidad con que se destruye la estructura que provoca la dependencia con el tiempo. Los valores más altos de B indican que una muestra es más susceptible a la pérdida de su estructura por acción mecánica (Fizman y col., 1999).

Tabla IV.12. Valores promedios estimados de los parámetros reológicos: *resistencia máxima inicial* (A), *velocidad de ruptura estructural* (B) y *variación porcentual* ($V\%$) de cada uno, para las experiencias del caso de estudio 1, a los 3 y 31 días de almacenamiento. R^2 : coeficiente de determinación obtenido de la modelo de Weltmann. $[A] = \text{Pa.s}$; $[B] = \text{Pa.s}$

Exp. N°	Día 3			Día 31			V%A	V%B
	A	-B	R ²	A	-B	R ²		
1	685,3	55,8	0,973	716	72,6	0,986	4,48	30,11
2	2060,5	214,5	0,994	2212,4	249	0,989	7,37	16,08
3	454	31,8	0,96	494	29,3	0,822	8,81	7,86
4	357,8	28,8	0,903	403	37,4	0,958	12,63	29,86
5	1558	170,7	0,99	1804,8	201,3	0,979	15,84	17,93
6	568,9	52,9	0,847	667,9	64,2	0,968	17,40	21,36
7	457,6	41,4	0,988	580,6	68,8	0,974	26,88	66,18
8	404,3	35,5	0,98	416,8	31,2	0,988	3,09	12,11
9	2149,6	267	0,934	2779,7	224,7	0,949	29,31	15,84
10	1002,3	54,9	0,977	1004,4	58	0,993	0,21	5,65
11	817,1	33,8	0,934	1289,5	37,8	0,924	57,81	11,83
12	989,7	68	0,986	1016,8	71,6	0,979	2,74	5,29
13	3100,5	301,3	0,995	4381,6	335,1	0,993	41,32	11,22
14	720	63,68	0,962	398,4	29,5	0,981	44,67	53,67

Los errores estándares fueron menores al 5%.

Al día 3, la muestra que presentó el mayor valor de A fue el experimento 13 (máxima concentración de G y GEC, intermedio AMM), con un valor de 3100,5 Pa.s; en cambio, la experiencia 4 (nula concentración de G y AMM, intermedia GEC) fue la que mostró el valor mínimo de dicho parámetro, cuyo valor fue igual a 357,8 Pa.s. En el

caso del parámetro B , nuevamente la muestra 13 fue la que presentó el valor máximo (301,3 Pa.s) y el experimentos 4 el valor más bajo de dicho parámetro (28,8 Pa.s).

Se observó que la muestra que presentó mayor resistencia inicial, mostrándose más compacta y viscosa (N° 13), fue la que presentó mayor velocidad de ruptura de su estructura, debido a que los hidrocoloides generan una pseudo-estructura resistente ficticia, que se desmorona rápidamente al tratarla mecánicamente (Rozycki y Seguro, 1995).

Los estadísticos del ANOVA correspondientes a los modelos propuestos para A y B al día 3, indican que los mismos son significativos ($p < 0,0001$), adecuados (R^2 y R^2 -ajustado $> 0,90$) y la falta de ajuste no significativa ($p > 0,05$) (tabla IV.13.). Para el caso de la resistencia máxima inicial $A_{día3}$, ésta depende directamente de G y GEC (términos lineales y cuadráticos de X_1 y X_3 significativos), siendo mayor la influencia de G .

Tabla IV.13. Coeficientes de regresión del modelo polinomial de segundo orden para A , B , (utilizando las variables del diseño codificadas) y estadísticos obtenidos a partir del análisis ANOVA de cada modelo, para el día 3 y 31 de almacenamiento de las leches fermentadas probióticas con colesterol reducido obtenidas para el caso de estudio 1.

Factores	Día 3		Día 31	
	A	B	A	B
C	508,65	76,74	233,18	54,5
X_1	847,76 ^{***}	102,21 ^{***}	1051,4 ^{***}	104,6 ^{**}
X_2		6,38		
X_3	291,16 ^{**}		405,9 [*]	14,21
$X_1 \cdot X_2$				
$X_1 \cdot X_3$				35,4 [*]
$X_2 \cdot X_3$				
$(X_1)^2$	695,93 ^{***}	75,61 ^{***}	1157,3 ^{**}	93,4 ^{***}
$(X_2)^2$		-32,41 [*]		
$(X_3)^2$	329,61 [*]		705,31 [*]	
Estadísticos				
R^2	0,9316	0,9417	0,9003	0,9510
R^2 -ajust. valor-F	0,9012	0,9158	0,8506	0,9292
Falta de ajuste (p-valor)	30,64	36,33	20,33	43,65
	0,0691	0,1470	0,3640	0,7225

Significancia: ^{*} $p \leq 0,05$; ^{**} $p \leq 0,01$; ^{***} $p \leq 0,001$.

En cambio, la velocidad de ruptura estructural $B_{día3}$ depende de G (términos lineal y cuadrático) y AMM (término cuadrático), siendo también mayor la dependencia con G . Por lo tanto, con una mayor concentración de este gelificante, se necesita un mayor esfuerzo de corte para comenzar a deformar la muestra y para romper la estructura, pero

a su vez la estructura se desmorona más rápido. Así, las muestras que tuvieron mayor resistencia inicial a la deformación (mayor A) generalmente fueron aquellas cuya estructura se destruyó más rápidamente (mayor B) siendo el experimento 13 (máxima concentración de G y GEC, intermedio AMM) quien cumplió con esto. Estos resultados concuerdan con los reportados por Basak y Ramaswamy (1994), Fiszman, Lluch, y Salvador (1999), entre otros.

A partir de las gráficas de superficie de respuesta y líneas de contorno de $A_{\text{día 3}}$ en función de G y GEC, manteniendo constante AMM en su proporción intermedia (figura IV.17. a y b) se puede ver que al aumentar el valor de G (principalmente), aumenta considerablemente $A_{\text{día 3}}$. La significancia de ambos términos cuadráticos produce una curvatura de la superficie “hacia arriba” al desplazarnos sobre cada variable, asemejándose la gráfica de superficie a un paraboloides elíptico.

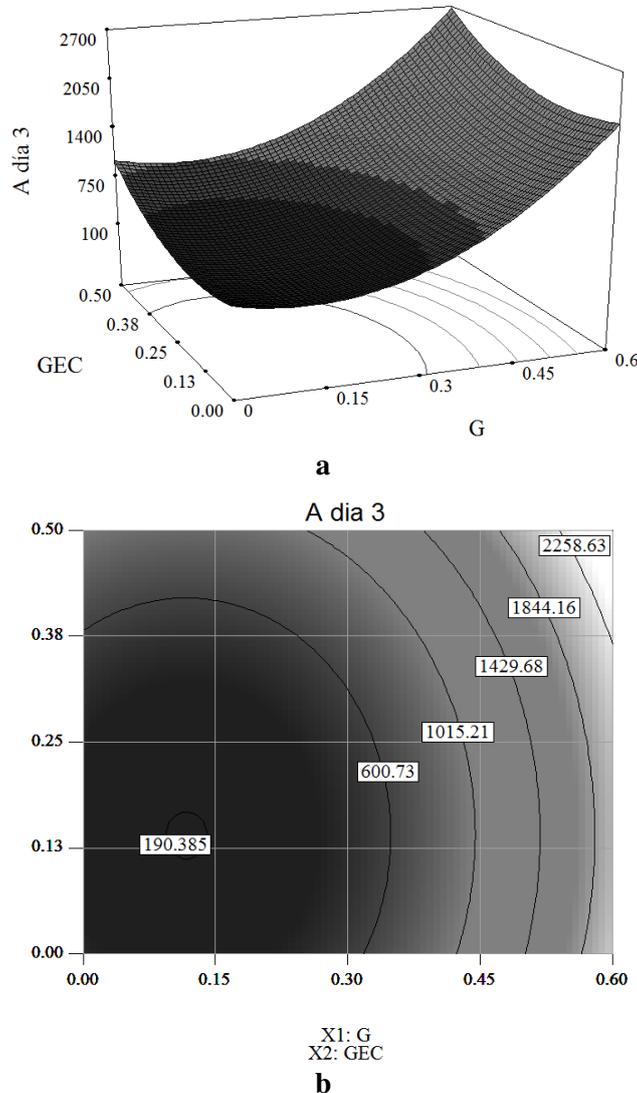


Figura IV.17. Gráficas de superficie de respuesta (a) y líneas de contorno (b) para $A_{\text{día 3}}$, en función de la concentración de G y GEC, manteniendo constante AMM y en su nivel intermedio, para el caso de estudio 1.

En el caso de $B_{\text{día3}}$, al no ser significativa la influencia de GEC sobre la respuesta, se obtuvieron las gráficas en función de G y AMM, manteniendo constante GEC y en su proporción intermedia (figura IV.18).

En este caso, debido a la presencia del término cuadrático negativo para el caso de AMM, y positivo para G, se obtiene una gráfica de superficie de respuesta similar a una silla de montar, propia de los paraboloides hiperbólicos. $B_{\text{día3}}$ toma los mayores valores cuando G es máxima y AMM se encuentra en el rango intermedio (0,5% m/m).

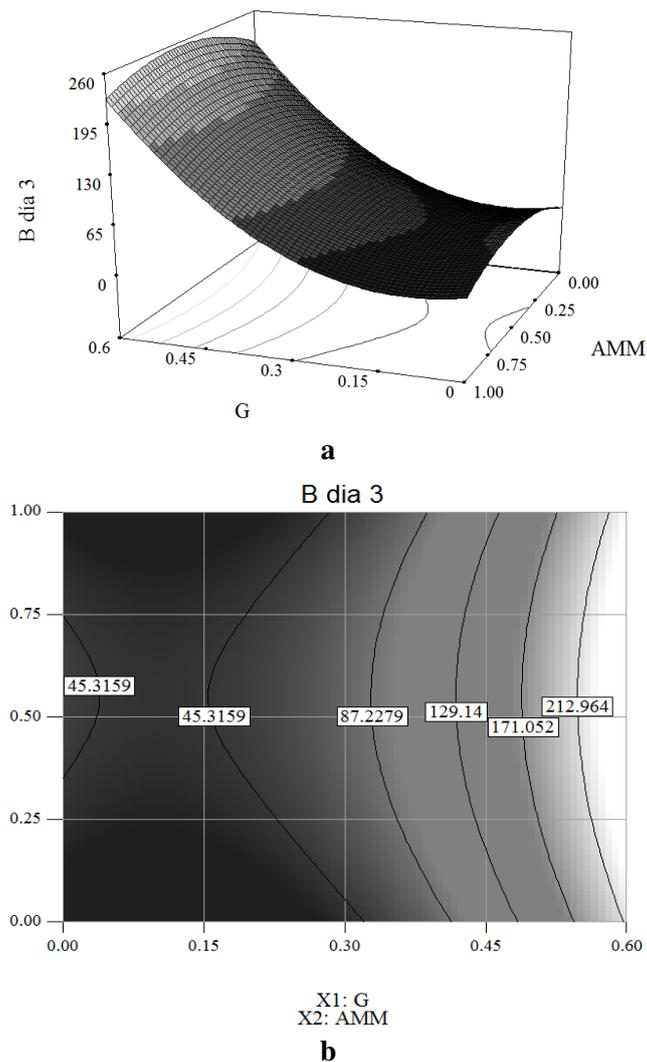


Figura IV.18. Gráficas de superficie de respuesta (a) y líneas de contorno (b) para $B_{\text{día3}}$, en función de la concentración de G y AMM, manteniendo constante GEC y en su nivel intermedio, para el caso de estudio 1.

Observando la tabla IV.12. puede señalarse que los valores de A y B, de cada muestra, tendieron a aumentar durante la vida de anaquel. Al día 31 se observó la

misma dependencia con las variables estudiadas que para el día 3, con una mayor significancia de la G por sobre los demás agentes espesantes. Se puede decir que los hidrocoloides empleados favorecen la formación de una estructura interna compacta, resistente al cizallamiento inicial, cuyas características aumentan durante la vida de anaquel.

A modo de resumen, todas las muestras presentaron comportamiento tixotrópico, ya que la viscosidad aparente disminuye gradualmente cuando las muestras están sujetas a un gradiente de deformación constante (en este caso 50 s^{-1}), tratando de imitar como sería la degradación estructural en la boca durante el consumo de leches fermentadas. Esta reducción, en estos tipos de productos, puede estar relacionada con varios factores. Lucey (2002) sugiere que esto es resultado de la destrucción de enlaces débiles y una disminución de la suma de la repulsión electrostática y la interacción hidrófoba entre las moléculas del gel. Karazhiyan et al. (2009) informaron de que el aumento de la velocidad de cizallamiento y disminución en la viscosidad se produce debido a una ruptura de las estructuras macromoleculares en solución, debido a la fuerza de cizallamiento. Otros autores informaron que las fuerzas hidrodinámicas, al principio de cizallamiento, son más intensas, causando una mayor ruptura. Con el tiempo, estas fuerzas generan un sistema de estiramiento que permite la alineación de las moléculas con la corriente o dirección de flujo y, en consecuencia, una reducción en los valores de viscosidad (Debón y col., 2010).

Por otro parte, las muestras con mayor contenido de G mostraron mayor A y B , y esta tendencia se mantuvo en el tiempo, aumentando los valores de los parámetros hacia fin de vida útil, en concordancia con el aumento de la consistencia ($> K$) y por lo tanto una estructura más firme y rígida que hace que se requiera un mayor esfuerzo cortante para que ésta sea degradada. Por su parte, GEC influye positivamente también para el caso de A pero con menos significancia. Lo mismo ocurre para AMM sobre B al día 31.

Desde el punto de vista académico, los ensayos reométricos proveen información útil para comprender la aplicación de modelos reológicos apropiados en este tipo de productos, y cómo afectan los hidrocoloides sobre los parámetros reológicos estudiados.

Desde el punto de vista industrial, la caracterización reológica de las leches fermentadas es requerida para el control de calidad, diseño y evaluación de los equipos y accesorios, operaciones unitarias y parámetros de procesos, vislumbrando la relación entre las propiedades estructurales y texturales y asegurando la aceptabilidad del consumidor.

IV.2.8. ANÁLISIS DEL PERFIL DE TEXTURA POR PENETROMETRÍA.

La reología del yogur y leches fermentadas se describe no sólo en términos de viscosidad, sino también en términos de lo duro, frágil, elástico y cohesivo que es. La textura y propiedades reológicas de los productos lácteos coagulados se ven afectadas por sus características estructurales, influenciadas por factores composicionales y de manufactura. Los analizadores de textura como el equipo Instron® permiten que los alimentos sean evaluados en tales términos. El análisis de perfil de textura se refiere principalmente a la medición de determinadas propiedades mecánicas de un producto, ya que se encuentra relacionado a las propiedades sensoriales detectadas por los seres humanos.

La tabla IV.14. muestra los valores medios obtenidos para los diferentes parámetros calculados a partir de los perfiles de textura (Fuerza vs. tiempo) para las diferentes leches fermentadas probióticas con colesterol reducido del caso de estudio 1, a los 3 y 31 días de almacenamiento; mientras que la tabla IV.15. resume los coeficientes de los términos significativos de los modelos obtenidos para todos los parámetros evaluados y sus estadísticos correspondientes.

IV.2.8.1. Dureza.

La dureza (Du) se define como la fuerza necesaria para alcanzar una deformación dada (Uprit y Mishra, 2004). Relacionando el término con la evaluación sensorial, la dureza simula la fuerza requerida para comprimir un alimento sólido entre los dientes molares o un producto semi-sólido (como es el caso de las leches fermentadas) entre la lengua y el paladar. En este trabajo, los valores de Du variaron entre 0,0492 N (exp. 3: sin G, máximo AMM, intermedio GEC) y 0,4020 N (exp. 9: máxima G, intermedio AMM, sin GEC) al día 3 de almacenamiento, mientras que al día 31 la variación fue entre 0,0488 N (exp. 3) y 0,4867 N (exp. 9) (tabla IV.14). En general, se observó un aumento de este parámetro durante la vida útil y la variación porcentual con respecto al inicio, fue diversa entre las muestras, siendo las muestras 11 y 14 las que más variaron sus durezas entre un período y otro, y la muestra 3 la que menos.

Tabla IV.14. Valores promedios estimados de los parámetros de perfil de textura por penetrometría: *Dureza (Du)*, *Adhesividad (Ad)*, *Elasticidad (El)*, *Cohesividad (Coh)*, *Gomosidad (Go)* y *Masticabilidad (Ma)* y variación porcentual (V%) de los mismos, estimados a partir de las curvas Fuerza vs. tiempo para las leches fermentadas probióticas con colesterol reducido del caso de estudio 1, a los 3 y 31 días de almacenamiento. [Du] = N, [Ad] = N.s⁻¹, [Go] = N; [Ma] = N

Parámetros	Experiencia N°													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
<i>Du</i> _{día3}	0,0637	0,2434	0,0492	0,0573	0,2538	0,1324	0,0604	0,0683	0,402	0,1477	0,0809	0,0922	0,3913	0,072
<i>Du</i> _{día31}	0,0508	0,2483	0,0488	0,0717	0,3155	0,1528	0,0682	0,0718	0,4867	0,1498	0,2235	0,0954	0,4065	0,1342
V% _{Du}	20,25	2,01	0,81	25,13	24,31	15,41	12,91	5,12	21,07	1,42	176,27	3,47	3,88	86,39
<i>Ad</i> _{día3} ^a	1,1969	3,1352	0,9076	1,0406	2,5226	1,6532	1,113	1,1232	3,8481	1,7025	1,4577	1,3562	3,7054	1,2392
<i>Ad</i> _{día31}	1,4685	3,9087	1,5015	1,6822	3,2541	2,0422	1,7044	1,9113	4,3742	2,6615	2,4042	2,5124	4,2977	1,5826
V% _{Ad}	22,69	24,67	65,44	61,66	29,00	23,53	53,14	70,17	13,67	56,33	64,93	85,25	15,98	27,71
<i>El</i> _{día3}	1,0009	0,9974	0,9854	1,0061	0,9952	1,0031	0,9825	0,9862	0,9883	0,9974	0,9951	0,9952	0,9882	1,0001
<i>El</i> _{día31}	0,9856	0,9809	0,9933	0,9918	0,9998	1,0012	1,002	0,9952	0,9912	0,9982	0,9975	0,9962	0,9915	0,9923
V% _{El}	1,53	1,65	0,80	1,42	0,46	0,19	1,98	0,91	0,29	0,08	0,24	0,10	0,33	0,78
<i>Coh</i> _{día3}	0,8124	0,6528	0,7231	0,7866	0,6832	0,7025	0,7761	0,7462	0,6739	0,7213	0,7369	0,7021	0,6328	0,7981
<i>Coh</i> _{día31}	0,6543	0,4224	0,5815	0,7065	0,4723	0,4932	0,6628	0,6031	0,447	0,5089	0,5918	0,5224	0,436	0,6824
V% _{Coh}	19,46	35,29	19,58	10,18	30,87	29,79	14,60	19,18	33,67	29,45	19,69	25,59	31,10	14,50
<i>Go</i> _{día3}	0,0517	0,1589	0,0356	0,0451	0,1734	0,0930	0,0469	0,0510	0,2709	0,1065	0,0596	0,0647	0,2476	0,0575
<i>Go</i> _{día31}	0,0332	0,1049	0,0284	0,0507	0,1490	0,0754	0,0452	0,0433	0,2176	0,0762	0,1323	0,0498	0,1772	0,0916
V% _{Go}	35,77	33,99	20,24	12,39	14,06	18,98	3,57	15,04	19,69	28,44	121,87	23,01	28,42	59,37
<i>Ma</i> _{día3}	0,0518	0,1585	0,0351	0,0453	0,1726	0,0933	0,0461	0,0503	0,2677	0,1063	0,0593	0,0644	0,2447	0,0575
<i>Ma</i> _{día31}	0,0328	0,1029	0,0282	0,0502	0,1490	0,0755	0,0453	0,0431	0,2156	0,0761	0,1319	0,0496	0,1757	0,0909
V% _{Ma}	36,75	35,08	19,60	10,79	13,67	19,13	1,66	14,26	19,46	28,39	122,40	22,93	28,18	58,13

^aValores absolutos. Los errores estándares fueron menores al 5%.

Tabla IV.15. Coeficientes de regresión del modelo polinomial de segundo orden para *Dureza (Du)*, *Adhesividad (Ad)*, *Cohesividad (Coh)*, *Gomosidad (Go)* y *Masticabilidad (Ma)* (utilizando las variables del diseño codificadas) y estadísticos obtenidos a partir del análisis ANOVA de cada modelo, para el día 3 y 31 de almacenamiento de las leches fermentadas probióticas con colesterol reducido obtenidas para el caso de estudio 1.

Factores	Día 3					Día 31				
	<i>Du</i>	<i>Ad</i>	<i>Coh</i>	<i>Go</i>	<i>Ma</i>	<i>Du</i>	<i>Ad</i>	<i>Coh</i>	<i>Go</i>	<i>Ma</i>
C	0,052	1,06	0,81	0,043	0,044	0,052	1,58	0,67	0,062	0,062
X₁	0,13***	1,09***	-0,047***	0,083***	0,082***	0,13***	1,07***	-0,096***	0,049**	0,048**
X₂			-0,015*				0,094	-0,037**	-9,87.10 ⁻⁴	-1,16.10 ⁻³
X₃	6,12.10 ⁻³	0,061	-0,013*	2,1.10 ⁻³	2,16.10 ⁻³	0,012	0,23**	-0,018*	6,75.10 ⁻³	6,75.10 ⁻³
X₁.X₂							0,21*	0,019*		
X₁.X₃						-0,059*	-0,19*		-0,032*	-0,032*
X₂.X₃			0,016*					0,024*		
(X₁)²	0,11***	0,92***	-0,053*	0,066**	0,065**	0,14**	0,97***	-0,060**	0,051**	0,051**
(X₂)²			-0,040**					-0,063**	-0,031*	-0,03*
(X₃)²	0,067*	0,47**	-0,047**	0,041*	0,041*	0,085*	0,67***	-0,074***	0,029*	0,029*
Estadísticos										
R²	0,9293	0,9417	0,9619	0,9201	0,9205	0,9112	0,9918	0,9858	0,9049	0,9019
R²-ajust.	0,8978	0,9158	0,9174	0,8846	0,8851	0,8557	0,9822	0,9634	0,7939	0,7875
valor-F	26,56	36,36	21,63	25,9	26,03	16,42	103,24	43,77	8,15	7,88
Falta de ajuste (p-valor)	0,1086	0,0739	0,4296	0,1106	0,1141	0,7073	0,3910	0,6635	0,8773	0,8702

Significancia: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

Los coeficientes de los términos de modelos matemáticos simplificados obtenidos para este parámetro se observan en la tabla IV.15. Por su parte, los estadísticos hallados mediante análisis ANOVA indican que los modelos explican con más de un 85% la variabilidad de los datos experimentales tanto para $Du_{día3}$ como $Du_{día31}$, la falta de ajuste resultó no significativa ($p > 0,05$) y el test F confirmó la significancia de los mismos ($p < 0,001$). X_1 (correspondiente a G) fue el único término lineal significativo dentro de los factores estudiados en ambos períodos. También fueron significativos los términos cuadráticos X_1 y X_3 y la interacción $X_1.X_3$ (sólo para día 31). A modo de ejemplo, se muestran las gráficas de superficie de respuesta y líneas de contorno encontradas para $Du_{día3}$ en función de G y GEC, manteniendo AMM constante y en concentración intermedia (figura IV.19.). A medida que aumenta la concentración de G, aumenta la $Du_{día3}$, observándose que por debajo de 0,3% de G existe una zona de mínimo de este parámetro (independientemente del valor de GEC). Las curvaturas “hacia arriba” sobre ambos ejes indica la participación positiva de los términos cuadráticos correspondientes a G y GEC. Por su parte, $Du_{día31}$ tuvo un comportamiento similar.

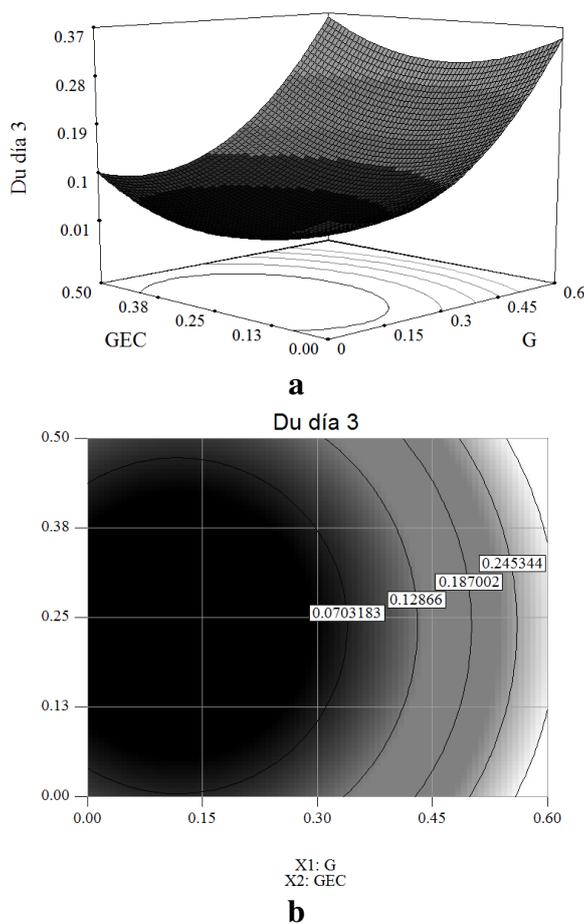


Figura IV.19. Gráficas de superficie de respuesta (a) y líneas de contorno (b) para $Du_{día3}$ en función de la concentración de G y GEC, manteniendo constante AMM y en nivel intermedio, para el caso de estudio 1.

De esta manera, aquellas muestras con mayor contenido de G (principalmente) resultaron más duras y firmes, lo que se observa en la dependencia directa con respecto al hidrocóide en estudio. Se ha visto por estudios con micrografías que aquellos yogures que poseen concentraciones más altas de G muestran una estructura densa, altamente ramificada con un interior con pocas celdas de aire; siendo al parecer que la G formaría una red dentro de la micela de caseína, generándose una estructura más firme (Supavititpatana y col. 2007).

IV.2.8.2. Adhesividad.

La adhesividad (Ad) resulta un área negativa en el ensayo realizado, pero para el análisis de datos se tomaron los valores absolutos. En el caso de la experiencia 9, ésta fue la que presentó mayor adhesividad tanto a los 3 como a los 31 días de vida útil ($3,8481 \text{ N}\cdot\text{s}^{-1}$ y $4,3742 \text{ N}\cdot\text{s}^{-1}$, respectivamente), mientras que las experiencias 3 (al día 3) y 1 (al día 31) presentaron los valores mínimos para este parámetro ($0,9076 \text{ N}\cdot\text{s}^{-1}$ y $1,4685 \text{ N}\cdot\text{s}^{-1}$, respectivamente). En general Ad se incrementó durante el almacenamiento y ese incremento por lo general fue superior al 20%, comparando con los valores al inicio (tabla IV.14.).

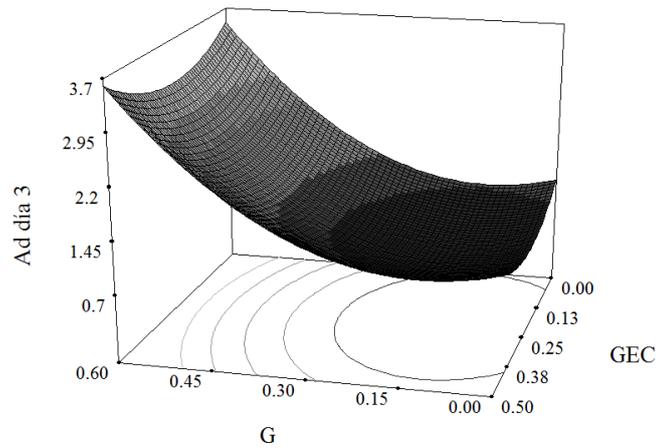
Se obtuvieron modelos matemáticos adecuados (R^2 y R^2 -ajustado $> 0,90$) y significativos ($p < 0,0001$) para Ad en ambos tiempos ensayados. La falta de ajuste fue no significativa ($p > 0,05$) (tabla IV.15.).

La $Ad_{día3}$, fue afectada por la concentración de G a través de los términos lineales y cuadráticos y por el término cuadrático de GEC. El término lineal de GEC es no significativo pero se lo adicionó para mantener la jerarquía del modelo. En la figura IV.20. se observa cómo disminuye $Ad_{día3}$ al reducir la concentración de G, sin importar prácticamente la concentración de GEC utilizada. Nuevamente, una zona de mínimo de la respuesta se observa en concentraciones por debajo de 0,3% m/m de G.

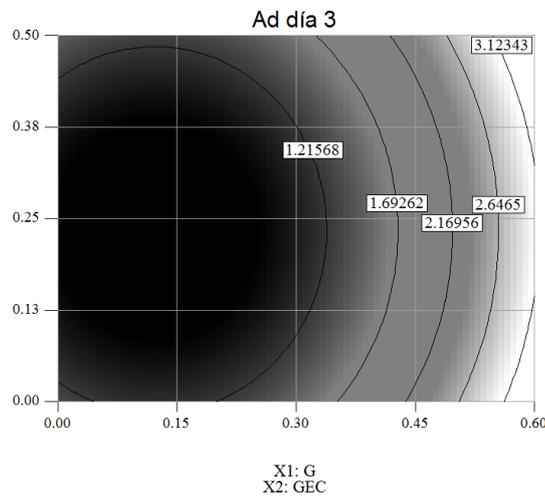
Para $Ad_{día31}$, los términos lineales correspondientes a G y GEC resultaron significativos (siendo de mayor significancia el término de G). A su vez, también las interacciones $X_1\cdot X_2$ y $X_1\cdot X_3$ y los términos cuadráticos X_1^2 y X_3^2 resultaron significativos para el modelo hallado. Esto significa que al aumentar la concentración de G (principalmente) y GEC aumenta el valor de $Ad_{día31}$.

A nivel global, las muestras que presentaron mayor Ad fueron las que contenían mayor porcentaje de G en su composición, independientemente de la cantidad de GEC y AMM, demostrando que se requiere una mayor fuerza para remover el material

adherido a la boca durante el consumo de aquellas leches fermentadas producidas con mayor contenido de G.



a



b

Figura IV.20. Gráficas de superficie de respuesta (a) y líneas de contorno (b) para $Ad_{día3}$ en función de la concentración de G y GEC, manteniendo constante AMM y en su nivel intermedio, para el caso de estudio 1.

IV.2.8.3. Elasticidad.

En términos físicos, la *Elasticidad (El)* es la relación de recuperación de la deformación después de retirar la fuerza ejercida. Sensorialmente, se podría describir como el grado en que un producto vuelve a su forma original luego de ser presionado por la lengua o los dientes (Szczesniak, 2002).

En este trabajo, todas las muestras presentaron una *El* (entre 0,98 y 1,00) similar entre ellas y durante el almacenamiento, por lo tanto la variación porcentual fue prácticamente despreciable (tabla IV.14., figura IV.21.), por lo tanto la *El* no se vio afectada por los aditivos estudiados. Estos resultados son contrarios a los hallados por

Supavitpatana y col. (2007) donde aquellas muestras con mayor concentración de G demostraron ser más elásticas, lo que sería que recuperaban su estructura original más rápidamente luego de haber eliminado la fuerza de deformación. Sin embargo, se pudo corroborar que los valores fueron similares a los obtenidos por Vercet y col. (2002) en trabajos sobre yogures, mientras que Kumar y Mishra (2004) no encontraron diferencias significativas entre yogures de soja adicionados con gelatina, pectina o alginato de sodio y el control (sin aditivos).

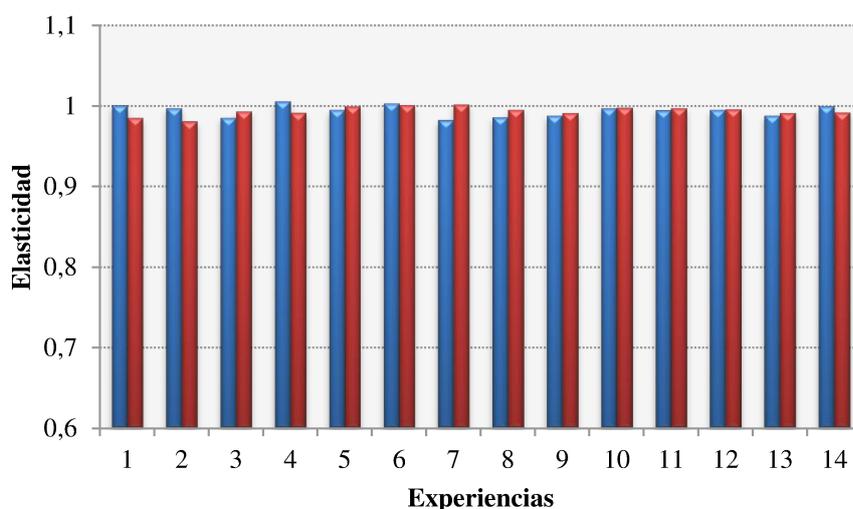


Figura IV.21. Elasticidad promedio para las experiencias del caso de estudio 1 en función del almacenamiento (día 3: azul y día 31: rojo).

IV.2.8.4. Cohesividad.

Por su parte, la *Cohesividad (Coh)* se define como el grado en que un material se puede deformar antes de su ruptura y depende de la fuerza de los enlaces internos (mayor es la fuerza, mayor es la cohesión). Desde el punto de vista sensorial, es el grado al cual la muestra se deforma antes de romperse cuando se mastica con los dientes molares.

En este trabajo los valores de *Coh* oscilaron entre 0,6328 (exp. 13: máxima G y GEC, intermedio AMM) y 0,8124 (exp. 4: sin G ni AMM, intermedio GEC) al día 3 posterior a la elaboración de las leches fermentadas, mientras que para el día 31, los valores fueron entre 0,436 (exp. 13) y 0,7065 (exp. 1: concentración intermedia de los 3 aditivos) (Tabla IV.14.). La variación porcentual entre ambos períodos fue entre 10-35% comparada con los valores al inicio.

La *Coh* disminuyó durante la vida útil. A medida que el tiempo de almacenamiento transcurre, se esperaría que el producto sea más cohesivo (sus partículas más unidas), según los resultados reológicos obtenidos en cuanto al aumento de consistencia y viscosidad. Por otra parte, la matriz proteica en los productos lácteos es la mayor responsable de la cohesividad. Al igual de lo que ocurre con los quesos, en el producto en estudio y durante el almacenamiento, la matriz proteica sufre proteólisis. Los componentes sufren reordenamientos de enlaces, asociaciones e interacciones que resultan que la microestructura del queso y yogures sea alterada (Ganesh, 2006), promoviendo comportamientos teóricamente no esperados, en concordancia con respecto a una matriz tan compleja como los productos lácteos formulados, entre otras cosas, con hidrocoloides.

Algunos investigadores (Maroziane y Kruif, 2000) observaron, en productos lácteos fermentados, que a concentraciones medias y bajas de hidrocoloides agregados sus moléculas se adsorben sobre las micelas de caseína, enlazándose a través de una floculación parcial, pero a elevadas concentraciones ($> 0,4 \%$) dichas micelas se recubren totalmente con las moléculas de hidrocoloides, y la atracción entre ellas disminuye.

Los modelos matemáticos obtenidos a partir de las regresiones múltiples para $Coh_{día3}$ y $Coh_{día31}$ pudieron explicar la variación de la respuesta en función de las variables de estudio. Los R^2 y R^2 – ajustado fueron superiores a 0,90, por lo tanto más del 90% de la variación de los resultados pueden explicarse por los modelos obtenidos en este caso. Por otro lado, los modelos fueron significativos al 99% de confianza y la falta de ajuste no significativa ($p > 0,05$). En ambos días, la *Coh* dependió linealmente y de manera negativa de las 3 variables en estudio siendo el orden de significancia: $X_1 > X_2 > X_3$ (es decir, que la influencia fue $G > AMM > GEC$). Por otro lado, la interacción $X_2.X_3$ y los términos cuadráticos X_1^2 , X_2^2 y X_3^2 fueron significativos (tabla IV.15.).

A partir de las gráficas de superficie de respuesta y líneas de contorno (figura IV.22.) se puede observar como el incremento de la gelatina y almidón modificado de mandioca producen un producto menos cohesivo, manteniendo GEC constante y en proporción intermedia, es decir que la estructura se desmoronaría más fácilmente cuanto mayor es el contenido de estos dos hidrocoloides.

Esto estaría relacionado con la velocidad de destrucción estructural (B) de los ensayos reológicos, donde los mayores valores de este parámetro se obtuvieron para aquellas muestras que contenían mayor concentración de hidrocoloides, y según este

último análisis también se observa que son menos cohesivas y más fácil de desmoronarse durante la primer mordida (tratamiento mecánico).

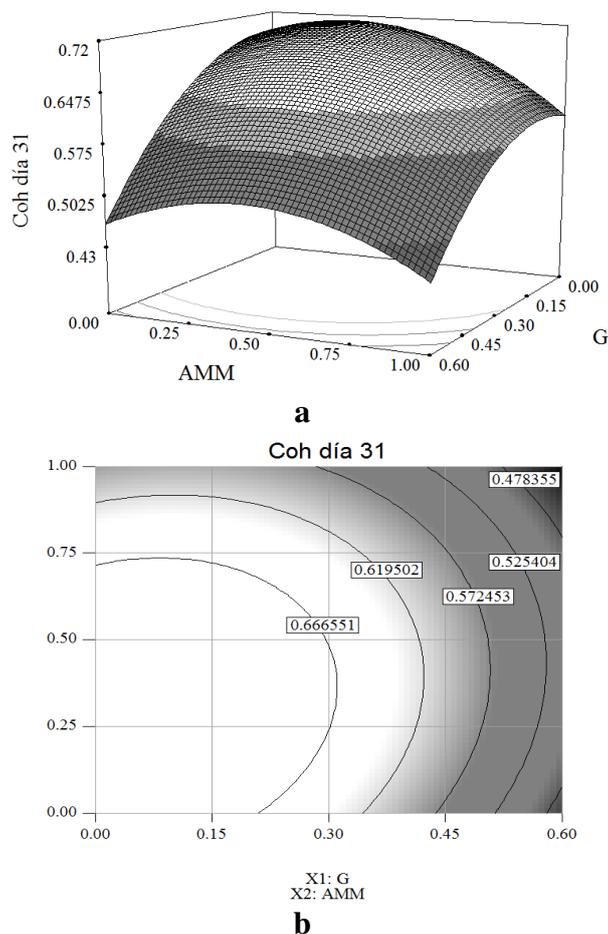


Figura IV.22. Gráficas de superficie de respuesta (a) y líneas de contorno (b) para $Coh_{día3}$ en función de la concentración de G y AMM, manteniendo constante GEC y en su nivel intermedio, para el caso de estudio 1.

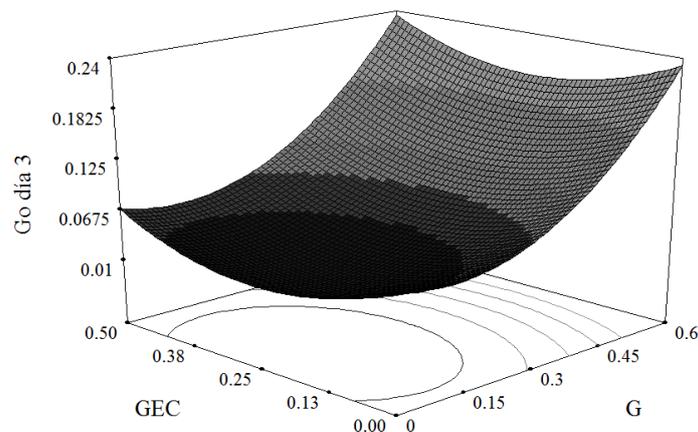
IV.2.8.5. Gomosidad y Masticabilidad.

La *Gomosidad* (Go) y *Masticabilidad* (Ma) para una misma muestra presentaron valores prácticamente iguales (debido a que la Ma se calcula a partir de la Go por la El y al ser la El prácticamente igual a 1, la Ma termina siendo igual que la Go).

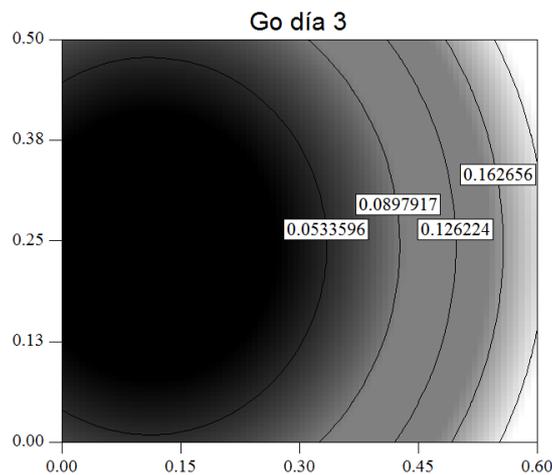
A los 3 días, los valores de ambos parámetros fueron desde 0,0356 (exp. 3: sin G, máximo AMM e intermedio GEC) hasta 0,2709 (exp. 9: máxima G, intermedio AMM y sin GEC). Las muestras con mayor contenido de hidrocoloides fueron las más gomosas (mayor energía para deglutir) y mayor energía se requiere para masticarlo, por presentar mayor dureza. Nuevamente, contrario a lo esperado, el almacenamiento provocó una disminución en los valores de ambos parámetros, debido a que ambos dependen de los valores de Coh (siendo que ésta también disminuyó).

Los modelos matemáticos permiten explicar que ambos parámetros tanto para el día 3 como el 31 de almacenamiento dependieron linealmente de la concentración de G (siendo X_1 el único término lineal significativo) y de los términos cuadráticos para X_1 y X_3 .

A modo de ejemplo, la figura IV.23. muestra lo anteriormente expuesto en las gráficas de contorno para $Go_{día3}$ en función de G y GEC, manteniendo AMM constante y en su concentración intermedia. El aumento de la G produce un aumento significativo en la respuesta, mientras que GEC sólo influye en la curvatura del sistema (a través del término cuadrático significativo de la ecuación obtenida).



a



X1: G
X2: GEC

b

Figura IV.23. Gráficas de superficie de respuesta (a) y líneas de contorno (b) para $Go_{día3}$ en función de la concentración de G y GEC, manteniendo constante AMM y en su nivel intermedio, para el caso de estudio 1.

Por lo tanto, se podría decir que la adición de G (principalmente) y en menor proporción GEC y AMM a la formulación de leches fermentadas contribuye a enaltecer las propiedades texturales como dureza, adhesividad, gomosidad y masticabilidad, en el caso de la cohesividad tiende a disminuir con el agregado de hidrocoloides, características que se pueden atribuir a la capacidad de retención de agua y propiedades gelificantes/espesantes de las variables en estudio (hidrocoloides). No se observaron diferencias en la elasticidad de las muestras analizadas. El almacenamiento promueve que los productos sean más duros, adhesivos y menos cohesivos.

IV.2.9. ANÁLISIS SENSORIAL.

IV.2.9.1. Descriptores de textura.

En la tabla IV.16. se presentan los valores promedios de los descriptores de textura: *Consistencia (Co)*, *Creemosidad (Cre)*, *Aspereza (Asp)* y *Astringencia (Ast)* para cada experiencia, a cada tiempo de ensayo (día 3 y 31 luego de elaboradas las leches fermentadas).

La *Co* y *Cre* fueron los atributos que mayor variación presentaron entre las muestras.

Para el caso de la *Co* la misma varió prácticamente en toda la escala considerada de 10 cm, obteniéndose puntajes desde 0,8 (exp. 3 y 8) hasta 9 (exp. 2) para el día 3 de almacenamiento, pudiéndose discriminar adecuadamente entre los distintos productos obtenidos y simulando las diferentes consistencias que se presentan en el mercado (desde yogurt tipo bebible a firme). A los 31 días, en general los valores promedios se incrementaron para las diferentes muestras, y se observó el mismo comportamiento que al día 3; esto también se puede corroborar a través de los gráficos de araña que se presentan en la figura IV.24. a). La experiencia 8 fue la que mayor variación presentó durante el almacenamiento (337,5%), mientras que el caso inverso se dio para la experiencia 2 (1,1%). Las muestras 2, 5, 9 y 13 (todas con máxima cantidad de G en su formulación) fueron las que menor variación presentaron entre principio y fin de vida útil (< 10%), lo cual es importante a la hora de trabajar con hidrocoloides, para contribuir a que las características necesarias del producto se mantengan durante toda la vida útil, en este caso la calidad sensorial respecto a la consistencia del producto.

En el caso de la *Cre* varió entre 2,40 (exp. 7) y 8,3 (exp. 2 y 5) al día 3 de elaboradas las leches fermentadas, y estos valores, se mantuvieron o incrementaron en poca proporción durante la vida de anaquel (generalmente la variación porcentual fue menor al 10%) (tabla IV.16). Tal como indica la figura IV.24. b) las gráficas de araña se encuentran prácticamente superpuestas en la valoración de cada una de las muestras en ambos tiempos de ensayos. En el caso de la experiencia 7 (sin G ni GEC, intermedio AMM), fue la que mayor variación presentó entre ambos períodos ensayados (%V 54,2%), incrementándose significativamente su percepción hacia el fin de vida útil.

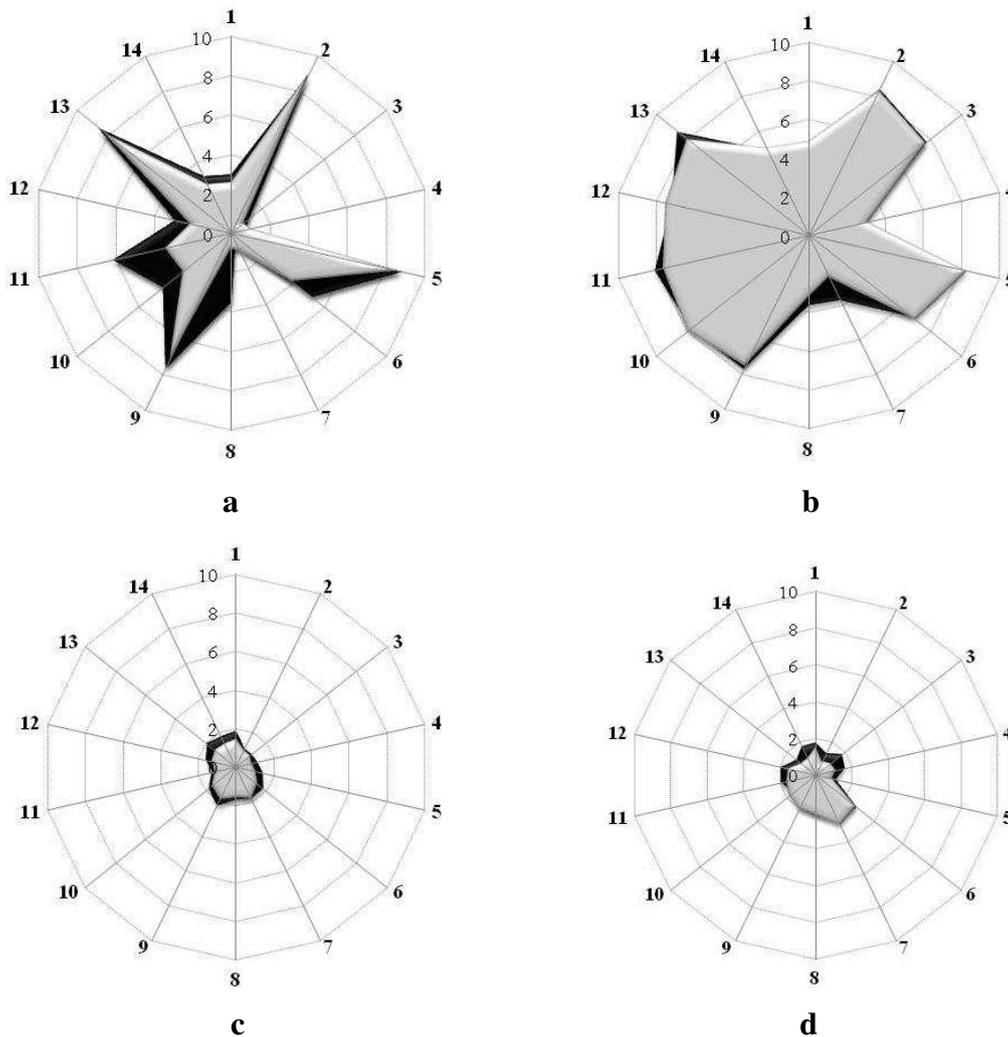


Figura IV.24. Diagramas de araña para cada descriptor de textura: a) *Consistencia*, b) *Cremosidad*, c) *Aspereza*, d) *Astringencia* que comparan los puntajes asignados a cada muestra para dos tiempos de ensayo (color gris: día 3 y color negro: 31), para el caso de estudio 1.

Tabla IV.16. Puntajes promedios para los descriptores de textura: *Consistencia (Co)*, *Creмосidad (Cre)*, *Aspereza (Asp)* y *Astringencia (Ast)* y variación porcentual (V%) de las muestras de leches fermentadas probióticas con colesterol reducido evaluadas sensorialmente a los 3 y 31 días de vida útil para el caso de estudio 1.

Exp. N°	CONSISTENCIA			CREMOSIDAD			ASPEREZA			ASTRINGENCIA		
	Días		%V	Días		%V	Días		%V	Días		%V
	3	31		3	31		3	31		3	31	
1	2,58	2,98	15,5	4,87	4,7	3,5	1,4	1,8	28,6	1,5	1,75	16,7
2	9	8,9	1,1	8,3	8,4	1,2	0,9	1	11,1	0,8	1,3	62,5
3	0,8	1,1	37,5	7,65	7,75	1,3	0,9	1	11,1	1	1,8	80
4	1	0,7	30	3,1	2,8	9,7	0,8	1,1	37,5	1,1	1,6	45,5
5	8,5	8,8	3,5	8,3	7,9	4,8	1	1,4	40	0,9	1,1	22,2
6	3,9	5,2	33,3	7	6,7	4,3	1,4	1,8	28,6	2,71	2,8	3,3
7	0,98	0,45	54,1	2,4	3,7	54,2	1,81	1,82	0,6	3	2,76	8
8	0,8	3,5	337,5	3,2	3,6	12,5	1,6	1,7	6,2	2,15	2,2	2,3
9	7,1	7,62	7,3	7,49	7,65	2,1	1,89	2,25	19	2,01	2	0,5
10	3,1	4,4	41,9	7,9	7,7	2,5	1,6	1,8	12,5	1,8	1,5	16,7
11	3,39	6,1	80	7,63	8,08	5,9	1,13	1,28	13,3	1,59	1,9	19,5
12	2,1	2,9	38,1	7,5	7,2	4	1,3	1,6	23,1	1,5	1,9	26,7
13	8,12	8,55	5,3	7,96	8,61	8,2	1,37	1,9	38,7	1	1,3	30
14	2,75	3,2	16,4	5,02	4,9	2,4	1,3	1,7	30,8	1	1,71	71

Los errores estándares fueron menores al 10%.

Los descriptores *Asp* y *Ast* recibieron puntuaciones bajas entre las diferentes muestras (Tabla IV.16. y Figura IV.24. c) y d)), y generalmente menor a 2, que se puede considerar como un límite aceptable por el panel evaluador. La percepción de los mismos también se incrementó durante el almacenamiento (entre un 0,6 – 40% para el caso de *Asp* y 0,5 – 80% para el caso de *Ast*).

Generalmente, las experiencias con máxima concentración de G obtuvieron los puntajes más elevados para *Co* y *Cre*. El mismo comportamiento se observó a los 31 días.

A través de regresión múltiple de los datos de *Co* (tabla IV.17.) con las variables de diseño codificadas, a los 3 y 31 días de almacenamiento, se obtuvieron modelos predictivos significativos ($p \leq 0,001$), que permitieron ajustar los valores experimentales muy adecuadamente y explicaron la variabilidad de los datos experimentales en más del 80%. Además, la falta de ajuste resultó ser no significativa ($p > 0,05$).

Como puede observarse en la tabla IV.17., la *Co* depende única y directamente de la concentración de G utilizada, es decir que la G gobierna la firmeza y consistencia de este tipo de producto, independientemente de las concentraciones de GEC y AMM utilizadas.

En la figura IV.25. a) se muestra la superficie de respuesta obtenida para *Co* en función de la concentración de G y GEC, manteniendo constante AMM en su proporción intermedia. Allí puede observarse que los valores más altos de *Co* sensorial se alcanzan a concentraciones mayores de G y que la respuesta solamente varía en función de esta sola variable, independientemente de la concentración de GEC Y AMM utilizadas. El término cuadrático significativo de G le otorga la curvatura al sistema. La gráfica de contornos (figura IV.25. b), por su parte, muestra líneas paralelas que hacen ver la dependencia solamente de G. El mismo comportamiento y dependencia con la variable G se observó al día 31.

Se encontraron modelos predictivos para intentar explicar el comportamiento de *Cre* respecto a las variables en estudio durante el almacenamiento (Tabla IV.17.). Se pudo observar que todos los términos de la ecuación polinomial cuadrática (lineales, interacciones y cuadráticos) resultaron ser significativos para este descriptor, demostrando que los 3 hidrocoloides influyen en la cremosidad del producto, en similar medida G y GEC con un poco menor influencia de AMM. Hacia el final de la vida útil la influencia de las tres variables es muy similar.

Tabla IV.17. Coeficientes de regresión del modelo polinomial de segundo orden para los descriptores de textura: *Consistencia (Co)*, *Cremosidad (Cre)*, *Aspereza (Asp)* y *Astringencia (Ast)* (utilizando las variables del diseño codificadas) y estadísticos obtenidos a partir del análisis ANOVA de cada modelo, para el día 3 y 31 de almacenamiento de las leches fermentadas probióticas con colesterol reducido obtenidas para el caso de estudio 1.

Factores	Día 3				Día 31			
	<i>Co</i>	<i>Cre</i>	<i>Asp</i>	<i>Ast</i>	<i>Co</i>	<i>Cre</i>	<i>Asp</i>	<i>Ast</i>
C	2,54	4,94	1,35	1,05	3,70	4,80	1,75	1,73
X₁	3,32 ^{***}	1,41 ^{***}	0,065 [*]	-0,25 [*]	3,19 ^{***}	1,28 ^{***}	0,17 [*]	-0,30 ^{***}
X₂		1,09 ^{***}	0,064 [*]			1,13 ^{**}	0,025 [*]	0,075
X₃		1,36 ^{***}	-0,21 ^{**}	-0,50 ^{***}		1,24 ^{**}	-0,12 ^{**}	-0,40 ^{***}
X₁.X₂		-1,14 ^{***}				-1,11 ^{**}		
X₁.X₃		-1,19 ^{***}				-0,86 [*]		
X₂.X₃		-0,85 ^{***}				-0,65 [*]		-0,25 ^{***}
(X₁)²	2,32 ^{**}	0,93 ^{***}	-0,24 [*]		1,58 ^{***}	1,31 ^{**}	-0,25 ^{**}	-0,19 ^{**}
(X₂)²		0,96 ^{***}	-0,21 [*]			0,60 [*]	-0,36 ^{**}	-0,085 [*]
(X₃)²		0,49 ^{**}	0,44 ^{**}	0,92 ^{***}		0,90 [*]	0,33 [*]	0,45 ^{***}
<i>Estadísticos</i>								
R²	0,8992	0,9986	0,9320	0,8700	0,8699	0,9865	0,8542	0,9912
R²-ajust.	0,8809	0,9955	0,8738	0,8310	0,8281	0,9560	0,7255	0,9810
valor-F	49,07	323,56	16	22,31	18,40	32,36	6,73	96,83
Falta de juste (p-valor)	0,0854	0,4635	0,3763	0,7703	0,0737	0,2115	0,2532	0,2800

Significancia: ^{*}p≤0,05; ^{**}p≤0,01; ^{***}p≤0,001

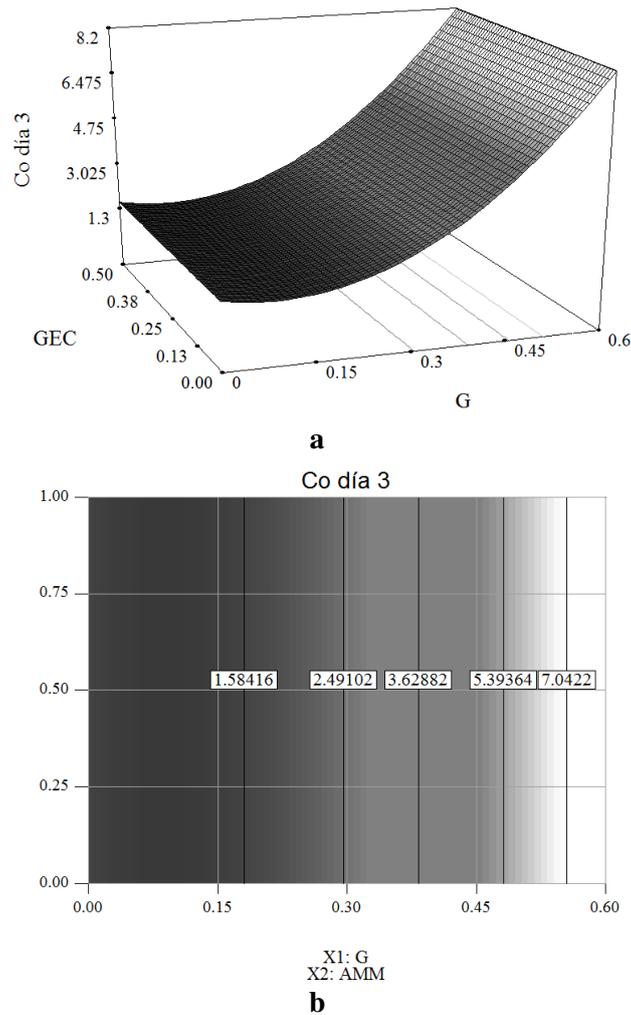


Figura IV.25. Gráficas de superficie de respuesta (a) y líneas de contorno (b) para $Co_{día3}$ en función de la concentración de G y GEC, manteniendo constante AMM y en su nivel intermedio, para el caso de estudio 1.

Los términos lineales y cuadráticos fueron positivos, las interacciones negativas; por ende, en todos los casos la influencia de cada una de las variables va a depender del valor que tome cualquiera de las otras 2. Analizando la figura IV.26., se puede observar que el valor de Cre aumenta al aumentar la concentración de G y AMM, manteniendo GEC constante en su nivel intermedio al día 3 de almacenamiento. La misma tendencia se observó hacia el fin de vida útil.

La *Creosidad* es esencial en varios productos lácteos y se la relaciona positivamente con la sensación de agrado en este tipo de productos. Los consumidores parecen considerar un producto "cremoso" cuando tiene un alto contenido de grasa, tiene sabor lácteo y una textura viscosa, resbaladiza y grasienta en la boca (Richardson-Harman y col., 2000; Johansen y col., 2008).

En sistemas fluidos, los sustitutos grasos derivados de hidratos de carbono, como AM, pueden impartir una sensación lubricante y de cremosidad cuando el alimento es consumido (Homsey, 2000; Johnson y col., 2009). Por su lado, G está caracterizada por proporcionar un cuerpo suave y cremoso a los alimentos bajos en grasa. La G atrapa los glóbulos grasos y promueve la percepción de cremosidad durante el consumo (Cole, 2000). Por su parte, los galactomananos como la GEC, son usados en formulaciones de bajo contenido graso para actuar como agentes espesantes para la lubricación y control de flujo, lo que ayuda a dar propiedades percibidas similares a la grasa (como sensación cremosa en la boca) (Roller & Jones, 1996).

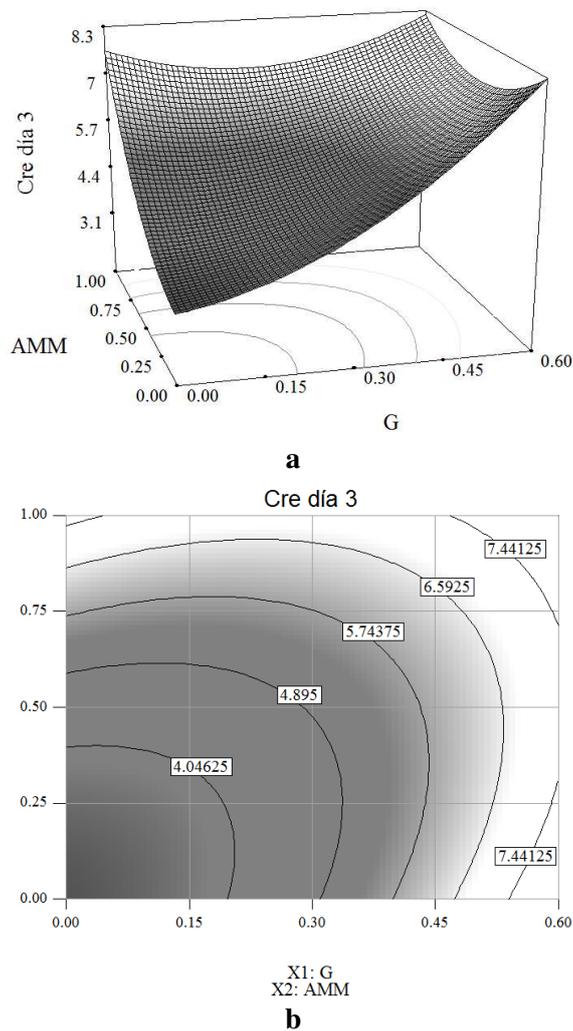


Figura IV.26. Gráficas de superficie de respuesta (a) y líneas de contorno (b) para $Cre_{dia\ 3}$, en función de la concentración de G y AMM, manteniendo constante GEC y en su nivel intermedio, para el caso de estudio 1.

En el caso de la *Asp* se encontraron modelos predictivos tanto para 3 como 31 días. El término lineal correspondiente a la GEC (X_3) resultó ser el más significativo dentro

de los términos lineales, disminuyendo el valor de este descriptor, al aumentar la proporción de este hidrocoloide, mientras que el término cuadrático de éste resultó positivo, otorgándole curvatura “hacia arriba” a la superficie de respuesta obtenida (Figura IV.27.a). La zona donde se hace mínima la respuesta estaría delimitada por concentraciones intermedias de GEC (entre 0,25 - 0,38 %m/m) (Fig. IV.27.b), independientemente del valor que tome G.

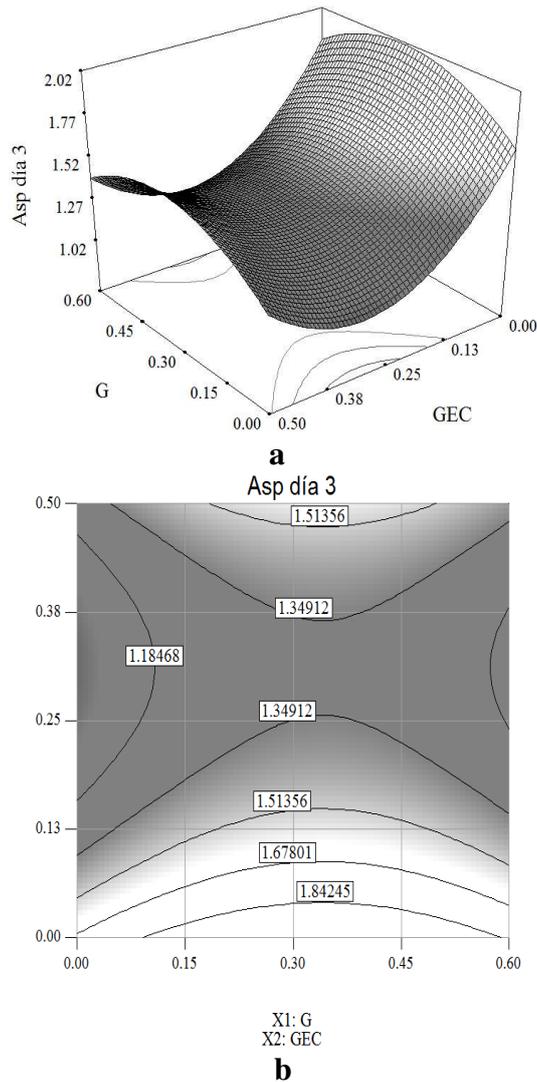
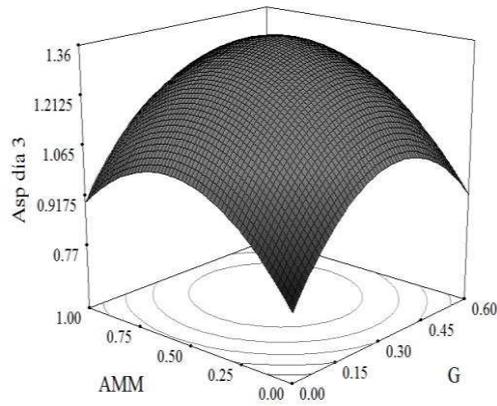


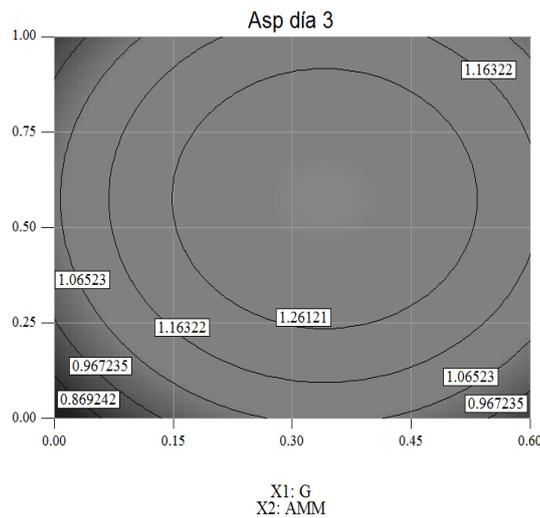
Figura IV.27. Gráficas de superficie de respuesta (a) y líneas de contorno (b) para *Asp_{día3}*, en función de la concentración de *G* y *GEC*, manteniendo constante *AMM* y en su nivel intermedio, para el caso de estudio 1.

Por su parte, los términos lineales de *G* y *AMM* indican una influencia directa de estas variables sobre la respuesta analizada, mientras que los términos cuadráticos resultan tener coeficientes negativos, lo que le da una curvatura “hacia abajo” a la

gráfica de superficie de respuesta cuando se analizan G y AMM, manteniendo GEC constante en su nivel intermedio (figura IV.28.). La zona de máximo valor para este descriptor estaría comprendida un poco por arriba del valor intermedio de G y AMM.



a



b

Figura IV.28. Gráficas de superficie de respuesta (a) y líneas de contorno (b) para $Asp_{día3}$, en función de la concentración de G y AMM, manteniendo constante GEC y en su nivel intermedio, para el caso de estudio 1.

A partir del ANOVA (Tabla IV.17.) se puede ver que el modelo de predicción desarrollado para la Ast resultó significativo ($p < 0,001$) y adecuado, siendo la falta de ajuste no significativa ($p > 0,05$). Analizando los coeficientes de determinación (R^2) se puede ver que el modelo explica el 87% de la variabilidad de los datos experimentales para el día 3, y el 99% para el día 31 de almacenamiento.

A través del análisis de los términos lineales de los modelos hallados, se observó que el aumento de G y GEC tiende a disminuir el valor de este descriptor, observándose una mayor influencia de la GEC sobre la respuesta. Esto significa que la *Astringencia*

disminuye más rápidamente con el aumento de GEC que con el aumento de G (figura IV.29.). No se observa influencia significativa del AMM. Este comportamiento se observó tanto al día 3 como al 31 después de elaboradas las leches fermentadas.

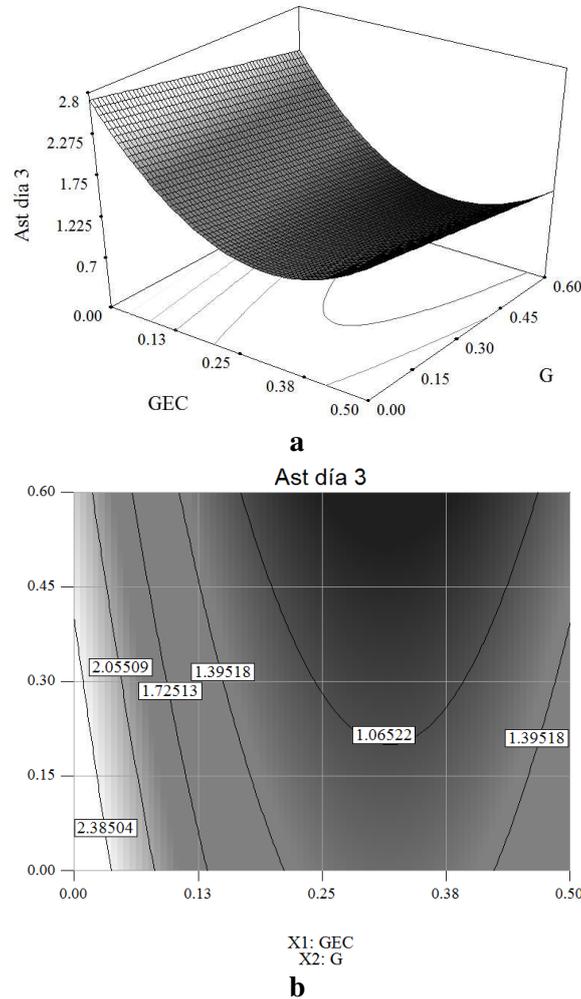


Figura IV.29. Gráficas de superficie de respuesta (a) y líneas de contorno (b) para $Ast_{día 3}$, en función de la concentración de G y GEC, manteniendo constante AMM y en su nivel intermedio, para el caso de estudio 1.

La Asp y Ast de un producto alimenticio son cuantificadas principalmente por evaluación sensorial, ya que resulta difícil utilizar algún instrumento de medida que pueda percibir estos atributos.

Por otro lado, las leches fermentadas en las cuales se percibe un alto grado de estos descriptores no son aceptables por los consumidores. Por lo tanto, es importante que los aditivos utilizados (como en el caso de los hidrocoloides) no incrementen este tipo de características o bien sirvan para enmascararlas (Gallardo-Escamilla y col. 2007). En este sentido, la GEC cumpliría un rol importante (cuando está en altas concentraciones) en el mantenimiento constante o estable de la calidad sensorial en cuanto a los

descriptores *Asp* y *Ast* durante el período de tiempo ensayado, siendo que aquellas muestras con mayor contenido de este hidrocoloide son las que menor puntaje presentaron de estos descriptores durante el almacenamiento.

A manera de resumen, se podría decir que la *Co* sensorial estaría gobernada y favorecida principalmente por la *G*, de la misma manera a lo que ocurrió en el análisis reológico (índice de consistencia, K_s y K_i); mientras que la GEC enmascararía la percepción de *Asp* y *Ast*, aunque estos descriptores tienen, en todas las muestras, valores bajos. Las 3 variables en conjunto, participarían en el aumento de la *Cre*. Además, las características texturales generalmente se conservan durante la vida de anaquel, lo que permite asegurar la calidad y estabilidad sensorial del producto.

IV.2.9.2. Descriptores de *flavor*.

El *flavor*, es una consecuencia de una compleja información sensitiva proporcionada por el gusto, el olfato y las sensaciones táctiles que se producen cuando un alimento está en la boca y se mastica. Los compuestos de *flavor* de las leches fermentadas están determinados por el balance entre: compuestos de *flavor* derivados de grasas, proteínas o carbohidratos y el *flavor* distintivo contribuido por el ácido láctico y una mezcla compleja de compuestos aromáticos, que incluyen los volátiles ya presentes en la leche y compuestos específicos producidos a partir de la fermentación de la leche.

Las tablas IV.18 y IV.19. muestran las medias ponderadas (Mp) y los porcentajes percibidos (%Perc.) de los descriptores de *flavor* (“crema”; “cocido”, “suero”, “ácido”, “leche en polvo” y “dulce”) obtenidos del panel de evaluadores entrenados, teniendo en cuenta para el cálculo los valores a los 3 y 31 días de almacenamiento, para cada experimento.

El promedio ponderado se calculó mediante la sumatoria de los puntajes asignados a cada opinión (1 = Apenas perceptible, 3 = Poco perceptible, 5 = Moderadamente perceptible, 7 = Muy perceptible, 9 = Extremadamente perceptible) por el número de panelistas que eligió dicha opinión, sobre el total de panelistas. Al trabajar con la media ponderada, a cada valor se le asigna una ponderación y por lo tanto algunos valores influirán más que otros. Por otro lado, el porcentaje percibido resulta ser el porcentaje de evaluadores que detectó el descriptor en algún nivel de intensidad, respecto del total de evaluadores entrenados.

Tabla IV.18. Puntajes medios ponderados y porcentajes percibidos para los atributos de *flavor*: “*crema*”, “*suero*”, “*leche en polvo*” para las diferentes muestras ensayadas del diseño de Box-Behnken a los 3 y 31 días de almacenamiento, para el caso de estudio 1.

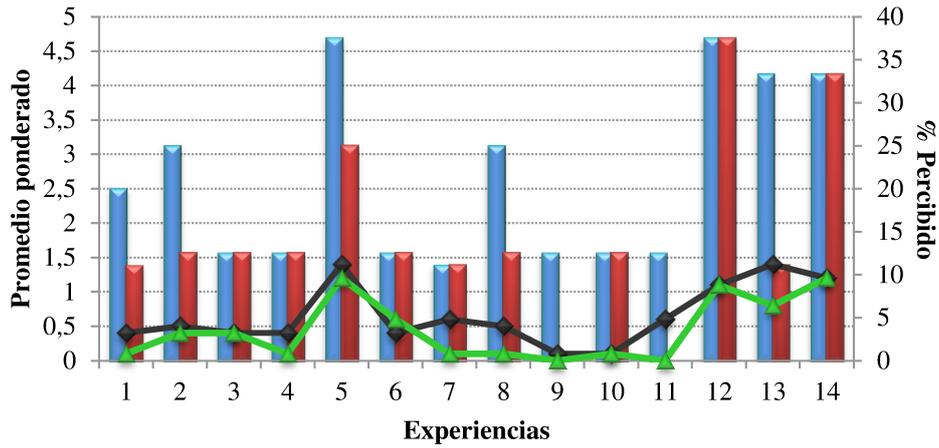
Exp. N°	“ <i>A crema</i> ”				“ <i>A suero</i> ”				“ <i>A leche en polvo</i> ”			
	Día 3		Día 31		Día 3		Día 31		Día 3		Día 31	
	Mp	%Perc.	Mp	%Perc.	Mp	%Perc.	Mp	%Perc.	Mp	%Perc.	Mp	%Perc.
1	0,4	20	0,1	11	0,5	10	0,3	11	0,6	20	0,4	22,2
2	0,5	25	0,4	12,5	0,6	12,5	0	0	0,9	37,5	1	25
3	0,4	12,5	0,4	12,5	2	50	1,1	37,5	1,9	50	0,9	37,5
4	0,4	12,5	0,1	12,5	0,4	12,5	1	25	0,9	37,5	0,5	25
5	1,4	37,5	1,2	25	0,6	12,5	0,4	12,5	1	25	0,6	12,5
6	0,4	12,5	0,6	12,5	0,5	25	0,1	12,5	0,8	25	0,6	12,5
7	0,6	11,1	0,1	11,1	1	33,3	0,6	11,1	0,2	22,2	0	0
8	0,5	25	0,1	12,5	1,1	25	0,6	12,5	2,8	75	1,9	62,5
9	0,1	12,5	0	0	1	25	0,6	28,6	0,1	12,5	0,7	14,3
10	0,1	12,5	0,1	12,5	0,9	12,5	1,1	12,5	0,5	25	1,1	37,5
11	0,6	12,5	0	0	0,6	12,5	0,9	28,6	0,8	25	0,9	28,6
12	1,1	37,5	1,1	37,5	1,1	37,5	1,1	37,5	1	25	0,6	12,5
13	1,4	33,3	0,8	11,1	0,9	22,2	0,7	22,2	0,8	33,3	0	0
14	1,2	33,3	1,2	33,3	0,1	11,1	0,4	22,2	0,9	22,2	0,7	22,2

Mp: Media ponderada; % Perc: Porcentaje percibido.

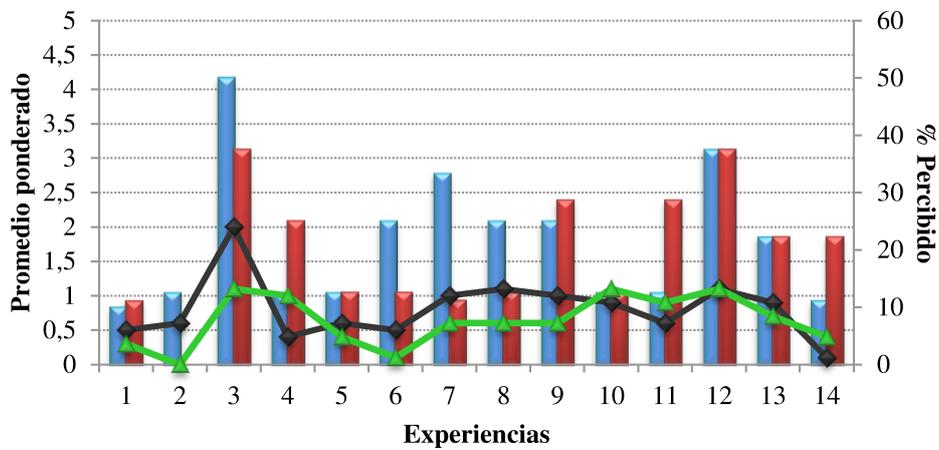
Al observar los valores de la tabla IV.18. y figura IV.30.a), se puede destacar que, en general, el gusto “*crema*” tuvo un comportamiento variable entre las muestras, los promedios ponderados oscilaron entre 0 y 1,4 para ambos tiempo de ensayo, llegándose a detectar en baja intensidad por pocos evaluadores, quedando la mayoría de las puntuaciones por debajo del rango en estudio (menores a 1). Por otro lado, menos de la mitad de los evaluadores lo percibieron durante el período de estudio (%Perc. < 40%). En la muestra 12 (intermedio G, sin AMM y máxima GEC) se percibió mayormente este atributo y en la misma intensidad (apenas perceptible) para los 3 y 31 días de almacenamiento. La muestra 5 (máxima G, sin AMM e intermedio GEC) fue la que obtuvo mayor puntaje de intensidad entre todas las muestras tanto a día 3 como 31. En todos los casos, la intensidad con la que se percibió fue menor hacia el fin de vida útil.

En cuanto al descriptor “*suero*”, puede señalarse que el promedio ponderado osciló entre 0,1 - 2 (día 3) y 0 - 1,1 (día 31) y, en general, fue percibido por menos del 40% de los panelistas, con excepción de la muestra 3 (50%) (tabla IV.18. y figura IV.30.b). Esta misma muestra fue la que obtuvo los promedios ponderados más elevados en ambos períodos de ensayo, calificando como apenas perceptible. No se observó un comportamiento definido de la percepción del *flavor* “*suero*” en el tiempo, ya que en algunas muestras se vio un aumento del mismo hacia el final de la vida útil, mientras que en otras el puntaje presentó una leve disminución o se mantuvo constante durante el tiempo de análisis. Se adicionó a todas las formulaciones del diseño una concentración constante de concentrado de proteínas de suero en polvo (3%), motivo por el cual es razonable que este sabor se detecte por los evaluadores entrenados. Aún así, los valores detectados para la mayoría de las experiencias resultó menor al punto mínimo de la escala, por lo cual sería altamente probable que los consumidores no identifiquen éste sabor.

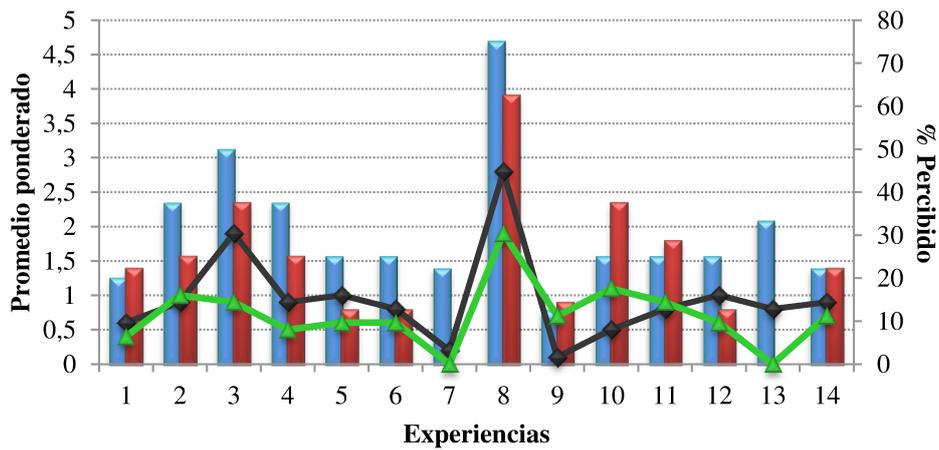
Los promedios ponderados obtenidos para el sabor a “*leche en polvo*” variaron entre 0,1 - 2,8 para el día 3, mientras que para el día 31 la variación fue entre 0 - 1,9. El porcentaje percibido, en general, fue menor al 40%, con excepción de las muestras 8 (ambos tiempos) y 3 (día 3). La experiencia 8 fue la que presentó mayor promedio ponderado, cercano a 3 (poco perceptible), siendo más del 60% de los evaluadores que percibió este descriptor, para ambos períodos. Por otro lado, ningún evaluador detectó este sabor en las muestras 7 y 13 al fin de vida útil. En general, la intensidad de este atributo disminuyó durante la vida útil (tabla IV.18. y IV.30.c).



a



b



c

Figura IV.30. Gráficos de líneas para los promedios ponderados (negro día 3, verde día 31) y gráficos de barras para el porcentaje percibido (azul día 3, rojo día 31) de los descriptores de flavor "crema" (a), "suero" (b) y "leche en polvo" de cada experimento en función del almacenamiento, para el caso de estudio 1.

Generalmente, no se detectó sabor “*cocido*”. La excepción la presentaron las muestras 2, 6, 8 y 14 (día 3 y 31), 11 y 12 (día 31) que obtuvieron puntuaciones en dicho descriptor, pero con un promedio ponderado menor a 2, siendo en la mayoría de ellas despreciable (menor a 0,5) (tabla IV.19. y figura IV.31.a). Por lo tanto, la intensidad del sabor “*cocido*” no dependería de la composición de las muestras, sino posiblemente de la metodología (discontinua) utilizada en el proceso de elaboración de las leches fermentadas (sobrecalentamiento durante el tratamiento térmico de la mezcla base inicial y/o baja velocidad de enfriamiento).

La percepción del gusto “*ácido*” (tabla IV.19. y figura IV.31.b) fue variable entre las diferentes muestras (promedios ponderados entre 0,1 – 3,8 al día 3 y 0,8 – 5,8 al día 31), y generalmente, tendió a aumentar hacia el final de la vida útil; lo que concuerda con lo esperado debido al aumento de acidez desarrollada en las leches fermentadas por la acción residual de las bacterias ácido lácticas, como resultado de la postacidificación de este tipo de productos, resultado que concuerda con la evolución de pH y acidez titulable encontrados durante el almacenamiento. Como es de esperarse una acidez típica en este tipo de productos, se considera una acidez aceptable con un puntaje entre 3 y 5 (poco y moderadamente perceptible) para este tipo de evaluaciones. Un elevado gusto ácido al principio de la vida útil puede deberse a una rápida fermentación por el cultivo starter debido a las altas temperaturas o a una concentración muy alta del inóculo bacteriano y/o un defectuoso enfriamiento. Por otro lado, una acidez muy baja acusa una actividad baja del cultivo starter.

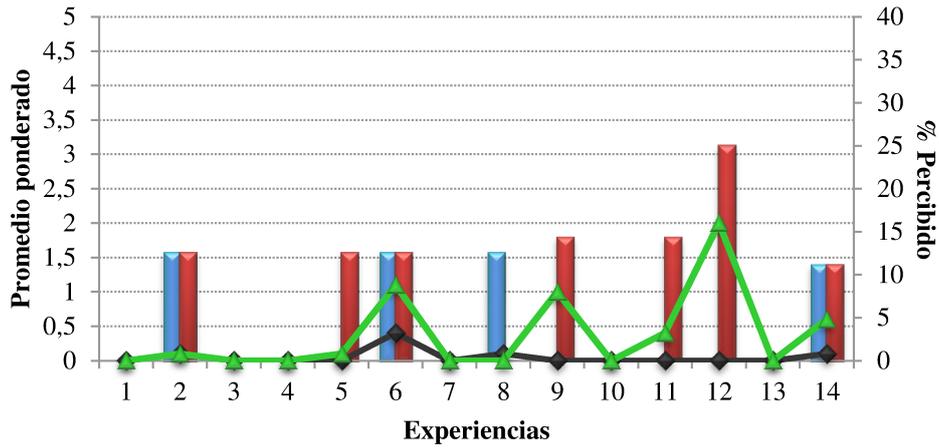
El 100% de los panelistas percibió el descriptor “*ácido*” en las muestras 1 y 14 (ambas correspondientes al centro del diseño, con proporción intermedia de los 3 hidrocoloides). Por otro lado, la muestra 5 fue la que menor promedio ponderado presentó y menor número de panelistas percibieron este atributo en ambos tiempos de ensayo.

Finalmente, los promedios ponderados para el descriptor “*dulce*” (tabla IV.19. y figura IV.31.c) oscilaron entre 1 – 3,8 (día 3) y 0,6 – 3,8 (día 31), y fue percibido en todas las muestras con diferente intensidad. No se observó un comportamiento definido de tendencia o aumento general en las puntuaciones de este atributo durante el almacenamiento. La muestra 10 se detectó como la más dulce en ambos períodos de ensayo. La adición de sacarosa y saborizante de vainilla a las formulaciones en adecuada cantidad ayuda al gusto dulce presente en las muestras, característica de agrado entre los consumidores.

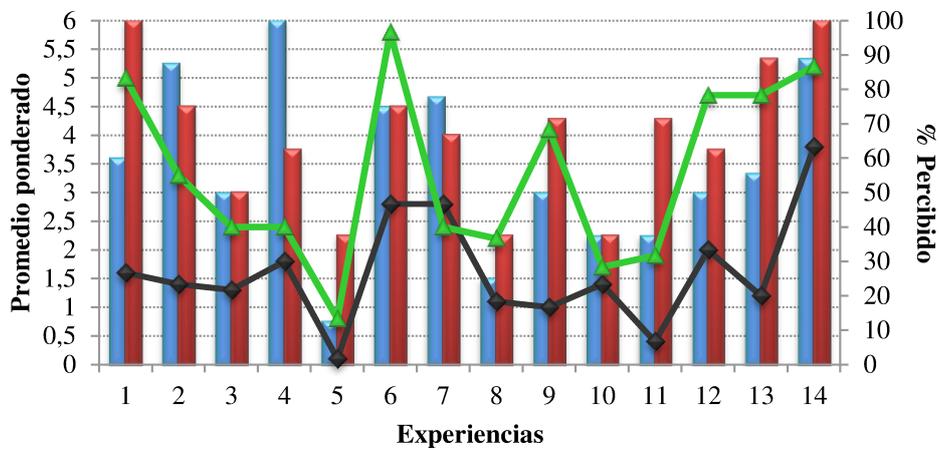
Tabla IV.19. Puntajes medios ponderados y porcentajes percibidos para los atributos de *flavor*: “cocido”, “ácido”, “dulce” para las diferentes muestras ensayadas del diseño de Box-Behnken a los 3 y 31 días de almacenamiento, para el caso de estudio 1.

Exp. N°	“Cocido”				“Ácido”				“Dulce”			
	Día 3		Día 31		Día 3		Día 31		Día 3		Día 31	
	Mp	%Perc.	Mp	%Perc.	Mp	%Perc.	Mp	%Perc.	Mp	%Perc.	Mp	%Perc.
1	0	0	0	0	1,6	60	5	100	1,8	60	2,8	55,5
2	0,1	12,5	0,1	12,5	1,4	87,5	3,3	75	3,3	75	2,8	75
3	0	0	0	0	1,3	50	2,4	50	3,2	87,5	2,8	62,5
4	0	0	0	0	1,8	100	2,4	62,5	3,4	62,5	2,9	62,5
5	0	0	0,1	12,5	0,1	12,5	0,8	37,5	2,4	62,5	1,4	37,5
6	0,4	12,5	1,1	12,5	2,8	75	5,8	75	1	25	1,4	37,5
7	0	0	0	0	2,8	77,8	2,4	66,7	2,4	66,7	1,9	55,6
8	0,1	12,5	0	0	1,1	25	2,2	37,5	2,6	37,5	2,6	62,5
9	0	0	1	14,3	1	50	4,1	71,4	2	75	0,6	28,6
10	0	0	0	0	1,4	37,5	1,7	37,5	3,8	62,5	3,8	62,5
11	0	0	0,4	14,3	0,4	37,5	1,9	71,4	3,1	62,5	1,6	42,9
12	0	0	2	25	2	50	4,7	62,5	1,7	37,5	3,8	62,5
13	0	0	0	0	1,2	55,6	4,7	88,9	2	65,7	1,9	44,4
14	0,1	11,1	0,6	11,1	3,8	88,9	5,2	100	1,7	33,3	2,2	44,4

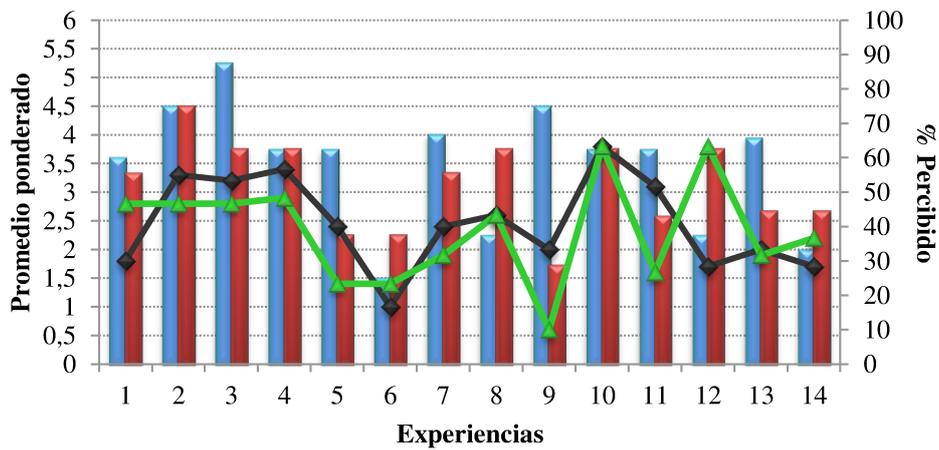
Mp: Media ponderada; % Perc: Porcentaje percibido.



a



b



c

Figura IV.31. Gráficos de líneas para los promedios ponderados (negro día 3, verde día 31) y gráficos de barras para el porcentaje percibido (azul día 3, rojo día 31) de los descriptores de flavor "cocido" (a), "ácido" (b) y "dulce" de cada experimento en función del almacenamiento, para el caso de estudio 1.

IV.2.9.3. Defectos.

El *flavor* de las leches fermentadas cambia continuamente durante la manufactura y el almacenamiento. Los cambios en la concentración de los compuestos relacionados con el *flavor* durante el almacenamiento son debido a reacciones que resultan en su formación o conversión a otros compuestos mediante la actividad metabólica de las enzimas bacterianas y sus pérdidas debido a la volatilización. La oxidación lipídica está reconocida como una de las principales causas del deterioro de la calidad durante el procesamiento o almacenamiento en productos lácteos. La aparición de sabores indeseables limita la vida útil y la estabilidad de los productos lácteos. La evaluación sensorial para encontrar este tipo de defectos resulta de gran importancia y puede ayudar a diferenciar leches fermentadas aptas para el consumo de aquellas que no lo son (Cheng, 2010).

En la tabla IV.20. se observan los promedios de los defectos encontrados en las muestras de leches fermentadas a los 3 y 31 días de vida útil. Para aquellos casos, en los que el promedio hallado fue menor a 0,5 puede considerarse que dicho defecto se encuentra ausente.

Tabla IV.20. Puntaje promedio de los defectos hallados por los panelistas entrenados en función de las experiencias y el tiempo de almacenamiento, para el caso de estudio 1.

Exp. N°	<i>Extraño</i>		<i>Viejo</i>		<i>Metálico</i>		<i>Rancio</i>		<i>Cartón</i>	
	Días		Días		Días		Días		Días	
	3	31	3	31	3	31	3	31	3	31
1	1,6	2,8	0,7	1,2	0	0	0	0	0	0
2	0,3	1,2	0	0,4	0,3	0,6	0	0	0	0
3	1,2	2	0	0	0	0	0,4	0	0	0
4	0,4	0,8	0	0,3	0,3	0,7	0	0	0	0
5	1	1	0	0	0,4	0,5	0,4	0	0	0
6	0,9	0,9	0,3	1,4	0,5	0,9	0,2	0,2	0	0
7	1,6	1,6	0,3	0	0,6	0	0,3	0	0,9	0
8	0,2	0,8	0	1,4	0,6	0,9	0	0	0	0
9	2,2	1,1	0,9	0	0,3	0,5	0	0	0,9	0
10	1,2	2,4	0	0	0	0	0	0	0	0
11	1,5	1,3	0	0,9	0	0	0	0	0	0
12	2,1	1,4	0,3	1,2	0,6	0,7	0,2	0,2	0	0
13	1,3	1	0	0	0,4	0,4	0	0	0,8	0
14	0	1	0	0	0	0,7	0	0	0	0

Un sabor “*Extraño*”, se refiere a un término no específico, relacionado con propiedades que no resultan agradables al consumo (Tomaschunas y col., 2012). Este defecto varió su puntuación entre 0 – 2,2 (al día 3) y 0,8 – 2,8 (al día 31), por lo tanto se

lo halló entre apenas y poco perceptible en las diferentes muestras. En general, se mantuvo constante o aumentó su intensidad durante el almacenamiento. La gráfica de barras al día 31 (figura IV.32.), indica que las muestras 1 y 10 son las que presentaron puntuaciones promedios más altas para este defecto, ocurriendo lo contrario para las muestras 4 y 8. Un defecto de *flavor* atípico en la mayoría de los productos lácteos es causado usualmente por la presencia de un aroma fuera de lugar o un mal sabor. Muchas veces el remanente de detergentes (utilizados en la limpieza de equipos) o una elevada concentración de sorbato de potasio pueden causar este defecto a nivel industrial.

De la misma manera el gusto “*A viejo*” que puede atribuirse a un almacenamiento inapropiado, se encontró en baja proporción (no superando el promedio de 1,4) en las muestras donde más se detectó por lo tanto califica como apenas perceptible, para las muestras 6 y 8 (día 31) (figura IV.32.). En las demás muestras su intensidad fue menor, y en algunos casos no se llegó a detectar. Generalmente, la percepción aumenta, no de manera marcada, hacia el último día de muestreo en comparación al inicio de la vida útil (día 3).

En las muestras en las que se detectó el defecto “*Metálico*”, el promedio hallado fue menor a 1 para ambos tiempos de ensayo, por lo tanto no se considera apreciable la intensidad del mismo en la escala utilizada. El mismo criterio califica para los defectos “*Rancio*” y “*Cartón*”, cuya intensidad promedio percibida es menor a 1, y a su vez se lo identificó en pocas muestras. La percepción de los mismos disminuyó durante el almacenamiento (tabla IV.20. y figura IV.32.).

Cabe señalar que no se encontraron tendencias que relacionen la variación de estos defectos en función de las variables investigadas, por lo que podría decirse que no existiría una dependencia de los defectos encontrados respecto a la composición variable de las leches fermentadas en estudio, sino que posiblemente se relacionarían con cuestiones asociadas al proceso de elaboración (materias primas en polvo, metodología discontinua de calentamiento y enfriamiento, falta de estanqueidad, etc.) y quizás a reacciones enzimáticas y del metabolismo de las BAL y otros microorganismos alterantes.

Por otro lado, no se encontraron defectos tales como “*oxidado*”, “*amargo*”, “*pungente*”, “*fermentado*”, que son característicos de hallarse en este tipo de productos.

Por todo lo mencionado, se estaría demostrando que los defectos hallados, además de recibir esporádicamente una puntuación muy baja (entre “*apenas*” y “*poco*”

perceptibles), no tendrían relación con las variables del diseño, sino que se debería probablemente a problemas asociados al proceso de elaboración y materias primas. Además, el tiempo de almacenamiento, en algunos casos (“*extraño*” y “*viejo*”) acentuó (levemente) la percepción de estos defectos y en otros casos (“*metálico*”, “*rancio*”, “*cartón*”) atenuó dicha percepción.

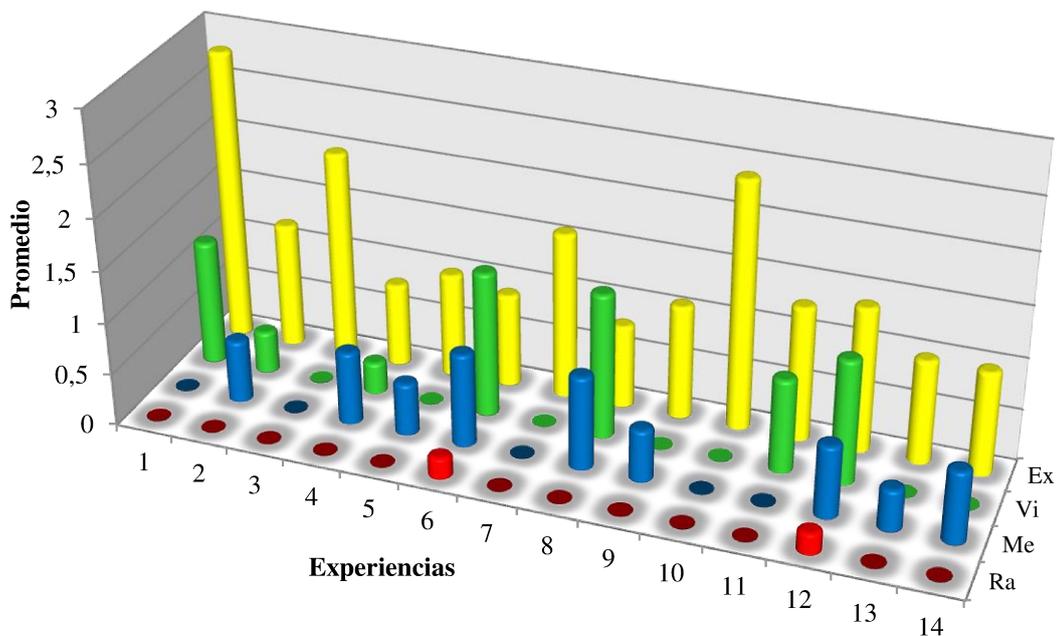


Figura IV.32. Puntaje promedio de defectos encontrados en las leches fermentadas al día 31 de almacenamiento, para el caso de estudio 1. Ex: extraño; Vi: viejo, Me: metálico, Ra: rancio.

Por otra parte, la elevada actividad acuosa característica de estos productos, favorece el crecimiento de microorganismos alterantes que pueden provocar la percepción de aromas y sabores extraños.

Por último, el defecto llamado “*oxidado*”, y también identificado como “*metálico*” o “*a cartón*”, tiene su origen en la oxidación; es decir, cuando ciertos componentes de la leche, en especial los fosfolípidos y el glicerol, tienen contacto con el oxígeno del aire. Favorecen también a su desarrollo: la luz, el calor y los residuos de metales. Según la causa e intensidad relativa, el defecto oxidado se caracteriza por la aparición de distintos sabores: a cartón, metálico, a sebo, a quemado, etc. En algunos casos, el desencadenante de la reacción de oxidación es el contacto con el hierro o el cobre, por ejemplo, al circular la mezcla base o el producto final por superficies mal estañadas (Spreer, 1991).

La contaminación por mohos o levaduras son la causa de aparición de otros defectos, especialmente en el aroma, apareciendo aromas indeseables en el producto como a “levaduras”, “afrutado” (o “a perfume”), “mohoso”, “amargo” y algunas veces a “jabón” o a “rancio”. Las levaduras están ampliamente distribuidas en la leche y productos lácteos. Pueden suponer un problema en el queso y en las leches fermentadas cuando se desarrollan incontrolablemente y se encuentran en gran número. Las alteraciones más frecuentes se producen en las leches fermentadas, cuyo elevado contenido en humedad favorece el crecimiento de dichos microorganismos. Por otra parte, el defecto “rancio” tiene que ver con la calidad de la leche (materia prima) utilizada y también al proceso de rancidez hidrolítica que está ligado a la materia grasa, y se debe a la liberación de los ácidos grasos volátiles por acción de las lipasas (www.portalechero.com).

En muchos casos los defectos del *flavor* (“putrefacto”, “extraño”, “afrutado”, “levadura”, “amargo”), además de tener dependencia con la contaminación de levaduras y mohos, están relacionados con las bacterias lácticas, debido a su actividad metabólica residual, por ejemplo reacciones de proteólisis, lipólisis, formación de aldehídos y ésteres. Asimismo, la refrigeración lenta o una larga conservación, puede dar lugar a alteraciones originadas principalmente por las bacterias psicrotrofas. Su acción proteolítica y lipolítica, produce la aparición de sabores amargos, a rancio, a malta y otros aromas extraños difíciles de definir (www.portalechero.com).

Se puede agregar que el defecto “extraño” en las leches fermentadas puede estar relacionado a inconvenientes con el uso de estabilizantes, a su incorrecta disolución en la matriz alimentaria, mientras que el defecto a “viejo” tendría que ver con un almacenamiento inapropiado (www.portalechero.com).

IV.2.10. OPTIMIZACIÓN DE MÚLTIPLES RESPUESTAS.

Para obtener diferentes formulaciones de leches fermentadas que semejen a yogures del tipo batido o firme, se propuso hacer una optimización simultánea de las respuestas estudiadas empleando la metodología desarrollada por Derringer y Suich, (1980). El método involucra la transformación de cada respuesta predicha, \hat{y} , a una función deseabilidad parcial adimensional, d_i . Se utilizan funciones de uno o dos lados, dependiendo de si las n respuestas estudiadas tienen que ser maximizadas, minimizadas

o tienen que tomar un valor objetivo. Por ejemplo si la respuesta i tiene que ser maximizada, la función d_i se define como

$$d_i = \left(\frac{\hat{y}-A}{B-A} \right)^{w_i}, \quad A \leq \hat{y} \leq B \quad (\text{ec. 37})$$

$$d_i = 1, \text{ para } \hat{y} > B$$

$$d_i = 0, \text{ para } \hat{y} < A$$

En la ecuación 37, A y B son los valores más bajo y más alto obtenidos para la respuesta i , respectivamente; y w_i es el peso. La función d_i varía entre 0, para una respuesta completamente indeseable, y 1, para una respuesta completamente deseable. Cuando el valor de w_i es igual a 1, la función d_i varía linealmente mientras se acerca al valor deseado.

Las funciones deseabilidad parcial (d_i) se combinan en una respuesta simple combinada, llamada función deseabilidad global (D) (ec. 38), definida como la media geométrica de los diferentes valores de d_i :

$$D = [d_1^{p_1} \times d_2^{p_2} \times \dots \times d_n^{p_n}]^{1/n} \quad (\text{ec. 38})$$

Un valor de D diferente de cero implica que todas las respuestas están simultáneamente en un rango deseable; para un valor de D cercano a 1, la combinación de los diferentes criterios es globalmente óptima. En la ec. 38, p_i es la importancia relativa asignada a la respuesta i . La importancia relativa p_i es una escala comparativa de peso de cada uno de las funciones d_i en el producto de la deseabilidad global, y varía desde la menos importante ($d_i = 1$) a la más importante ($d_i = 5$).

De esta manera, se calculó la función deseabilidad de Derringer (deseabilidad global), utilizando los modelos matemáticos obtenidos para algunas de las respuestas estudiadas y las variables ensayadas. Los criterios de optimización para cada factor y respuesta fueron elegidos a los 31 días de almacenamiento, para garantizar la estabilidad física y sensorial del producto al final de vida útil (tabla IV.21.). En general, para ambos tipos de productos (leches fermentadas tipo batido y firme), fue deseable lograr maximizar la $V_{m\acute{a}x}$ de la tasa de acidificación y que la fermentación dure entre 4 y 6 horas. Por otro lado, asegurar una adecuada *Cremosidad* (puntaje mayor que 5), baja *Aspereza* y *Astringencia* (puntaje menor a 2), y los demás criterios (reológicos,

sensoriales y texturales) se variaron conforme el tipo de leche fermentada requerida. Por otro lado, algunos autores describen que concentraciones muy altas de espesantes pueden perjudicar la palatabilidad de un yogur (Supavitpatana y col., 2008) y por este motivo se decidió minimizar la concentración de G, AMM y GEC (en ambas formulaciones).

La formulación óptima predicha fue 0,34% de G y 0,21% GEC para obtener una leche fermentada tipo yogur batido (con una deseabilidad global de 0,563), mientras que la adición de 0,53% de G, 0,04% AMM y 0,10% GEC fueron los valores predichos para un yogur tipo firme (deseabilidad global de 0,521) (tabla IV.21. y figura IV.33.).

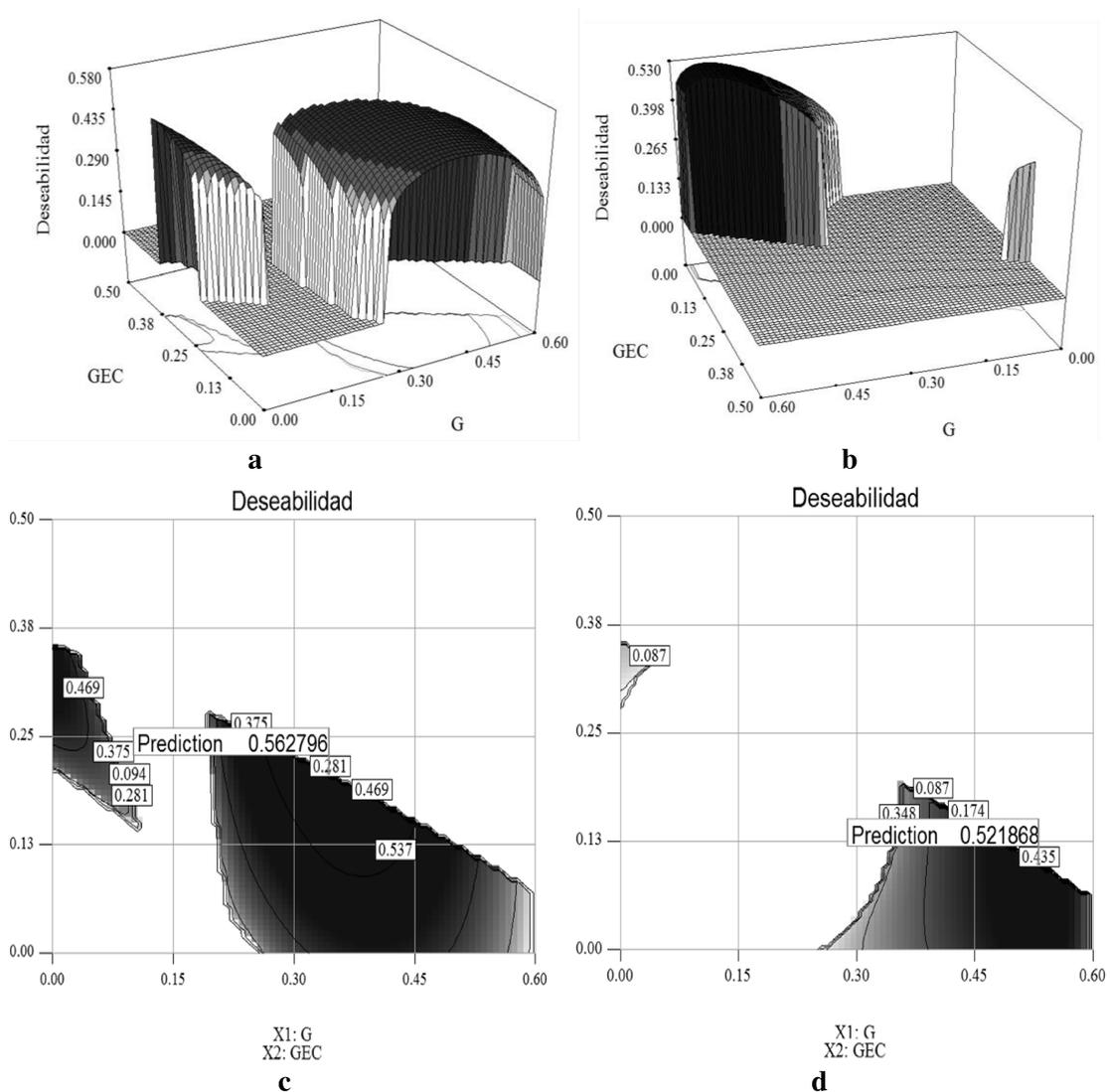


Figura IV.33. Gráficas de superficie respuesta y líneas de contorno para la función Deseabilidad global de Derringer obtenida para la optimización simultánea de las variables (G, AMM y GEC) y las respuestas ($V_{m\acute{a}x}$, $t_{f\grave{i}n}$, $Ks_{d\acute{i}a31}$, $A_{d\acute{i}a31}$, $B_{d\acute{i}a31}$, $Co_{d\acute{i}a31}$, $Cre_{d\acute{i}a31}$, $Asp_{d\acute{i}a31}$, $Ast_{d\acute{i}a31}$, $Du_{d\acute{i}a31}$) en el caso de querer obtener un yogur tipo batido (a y c) o un yogur tipo firme (b y d).

Tabla IV.21. Criterio de optimización adoptado en los diferentes factores (G, AMM, GEC) y respuestas ($V_{m\acute{a}x}$, t_{fin} , $Ks_{d\acute{a}a31}$, $A_{d\acute{a}a31}$, $B_{d\acute{a}a31}$, $Co_{d\acute{a}a31}$, $Cre_{d\acute{a}a31}$, $Asp_{d\acute{a}a31}$, $Ast_{d\acute{a}a31}$, $Du_{d\acute{a}a31}$) y solución óptima para obtener leches fermentadas probióticas con colesterol reducido del tipo batido y tipo firme, para el caso de estudio 1.

Leche fermentada probiótica con colesterol reducido “tipo-batido”						Leche fermentada probiótica con colesterol reducido “tipo firme”				
	Objetivo deseado	Valor mínimo	Valor máximo	Importancia	Mejor solución	Objetivo deseado	Valor mínimo	Valor máximo	Importancia	Solución
G	minimizar	0	0,6	5	0,34	minimizar	0	0,6	5	0,53
AMM	minimizar	0	1	3	0	minimizar	0	1	5	0,04
GEC	minimizar	0	0,5	3	0,21	minimizar	0	0,5	5	0,10
$V_{m\acute{a}x}$	maximizar	0,0058	0,0127	3	0,0089	maximizar	0,0058	0,0127	3	0,01
T_{fin}	en rango	4	6	3	4	en rango	4	6	3	4
$Ks_{d\acute{a}a31}$	minimizar	0,9609	3,284	5	1,572	maximizar	0,9609	3,284	5	1,91
$A_{d\acute{a}a31}$	minimizar	398,4	4381,6	3	360,68	maximizar	398,4	4381,6	3	1749,6
$B_{d\acute{a}a31}$	maximizar	29,26	335,1	3	68,27	minimizar	29,26	335,1	3	165,7
$Co_{d\acute{a}a31}$	minimizar	0,45	8,9	5	4,19	maximizar	0,45	8,9	5	7,10
$Cre_{d\acute{a}a31}$	maximizar	2,8	8,61	5	5,36	maximizar	2,8	8,61	5	6,48
$Asp_{d\acute{a}a31}$	minimizar	1	2,25	3	1,46	minimizar	1	2,25	3	1,64
$Ast_{d\acute{a}a31}$	minimizar	1,1	2,8	3	1,56	minimizar	1,1	2,8	3	1,51
$Du_{d\acute{a}a31}$	minimizar	0,0488	0,487	3	0,076	maximizar	0,0488	0,487	3	0,28

IV.2.11. VERIFICACIÓN DE LOS MODELOS OBTENIDOS CON EXPERIENCIAS COMPLEMENTARIAS.

Con el fin de verificar los modelos obtenidos, para todas aquellas respuestas ensayadas, que han resultado significativos y adecuados se realizaron 6 experiencias complementarias (exp. 14 a 19), cuyas formulaciones se encontraron dentro de la región experimental estudiada, a saber: **14** (0,3% G, 0,5% AMM, 0% GEC), **15** (0,3% G, 0,5% AMM, 0,5% GEC), **16** (0,3% G, 1% AMM, 0,25% GEC), **17** (0% G, 0,5% AMM, 0,25% GEC), **18** (0,3%, 0% AMM, 0,25% GEC), **19** (0,6% G, 0,5% AMM, 0,25% GEC).

Se pudo observar que el error porcentual entre el valor predicho por el modelo y el valor experimental (muestras complementarias) generalmente fue menor al 10%, concluyendo que se pueden aceptar los modelos obtenidos como buenos predictores de las respuestas estudiadas, permitiendo explicar la variabilidad del sistema en estudio, en las condiciones tecnológicas ensayadas.

IV.3. CASO DE ESTUDIO 2: EFECTO DE LAS CONDICIONES DE COAGULACIÓN SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS, REOLÓGICAS, TEXTURALES, MICROBIOLÓGICAS Y SENSORIALES DE LECHE FERMENTADAS PROBIÓTICAS CON COLESTEROL REDUCIDO.

La tabla IV.22. muestra el diseño factorial con el set de corridas experimentales y los respectivos valores de las variables codificadas y sin codificar para el caso de estudio 2, donde se estudió el efecto del calcio y caseínas adicionados sobre las características fisicoquímicas, reológicas, texturales, microbiológicas y sensoriales de leches fermentadas probióticas con colesterol reducido.

Tabla IV.22. Corridas experimentales del diseño factorial para el estudio de condiciones de coagulación con los valores de las variables codificadas y sin codificar. (%CAL: % m/m calcio (X_1), %CAS: %m/m Caseína (X_2)).

Exp N°	Variables no codificadas		Variables codificadas	
	% CAL	% CAS	X_1	X_2
1	0,05	0,42	0	0
2	0,05	0,076	0	-1
3	0,091	0,076	1	-1
4	0,009	0,076	-1	-1
5	0,091	0,764	1	1
6	0,009	0,764	-1	1
7	0,05	0,764	0	1
8	0,091	0,42	1	0
9	0,009	0,42	-1	0
10*	0,05	0,42	0	0

10 experiencias con una repetición del punto central (°)

IV.3.1. ANÁLISIS DE LA CINÉTICA DE ACIDIFICACIÓN DURANTE LAS FERMENTACIONES.

En la figura IV.34. se muestra las curvas de pH y acidez en función del tiempo de fermentación para la experiencia 2 (intermedio CAL y mínima CAS). Como puede verse, el pH disminuye y la acidez aumenta como resultado de la producción de ácido láctico (principalmente) por las bacterias acidificadoras.

Durante la acidificación de la leche se produce la alteración de las propiedades estructurales internas de las micelas de caseína debido a la solubilización del fosfato de calcio coloidal. A medida que las caseínas alcanzan su punto isoeléctrico, la carga neta negativa sobre la caseína se reduce, lo cual disminuye la repulsión electrostática entre los grupos cargados, incluyendo los residuos fosfoserina que están expuestos cuando el fosfato de calcio se solubiliza. Aumentan las interacciones electrostáticas y las atracciones proteína-proteína también se incrementa a través del aumento de las interacciones hidrofóbicas (Lee y Lucey, 2010).

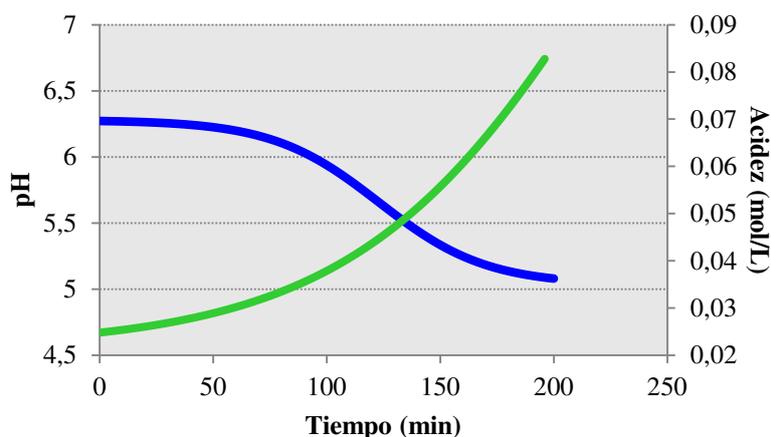


Figura IV.34. Curvas de pH (azul) y acidez (verde) en función del tiempo de fermentación para la experiencia 2, del caso de estudio 2.

Con los datos obtenidos de pH en función del tiempo de fermentación de cada experiencia, se calcularon los parámetros: $V_{m\acute{a}x}$, $t_{V_{m\acute{a}x}}$, $pH_{V_{m\acute{a}x}}$, t_{fin} (tabla IV.23.). Como puede observar, los valores absolutos de $V_{m\acute{a}x}$ variaron entre $10,25 \cdot 10^{-3}$ upH.min⁻¹ (muestra 8: máximo CAL e intermedia CAS) y $18,34 \cdot 10^{-3}$ upH.min⁻¹ (muestra 4: mínimo de ambas variables), siendo el tiempo requerido para llegar a esas velocidades de 2,83 y 2,9 horas, respectivamente. El pH para lograr la velocidad máxima ($pH_{V_{m\acute{a}x}}$) varió entre 5,3 (muestra 3: máximo CAL y mínima CAS) y 5,67 (muestra 10:

intermedio CAL y CAS). Por último, la fermentación duró entre 3,32 y 4,06 horas (t_{fin}) para las muestras 3 y 8, respectivamente.

Tabla IV.23. Valores de $V_{m\acute{a}x}$ (valor absoluto), $t_{V_{m\acute{a}x}}$, $pH_{V_{m\acute{a}x}}$ y t_f para las cinéticas de acidificación de las diferentes muestras del caso de estudio 2.

Exp. N°	$V_{m\acute{a}x}$ ($\cdot 10^{-3} \text{upH}\cdot\text{min}^{-1}$)	$t_{V_{m\acute{a}x}}$ (h)	$pH_{V_{m\acute{a}x}}$	t_f (h)
1	12,51	2,99	5,6	4
2	13,19	2,05	5,65	3,33
3	10,36	2,21	5,3	3,32
4	18,34	2,9	5,66	3,88
5	11,25	2,2	5,62	3,58
6	15,24	3,68	5,31	3,96
7	12,02	2,75	5,61	3,78
8	10,25	2,83	5,6	4,06
9	17,73	2,81	5,41	3,65
10	11,01	2,2	5,67	3,56

Se logró obtener un modelo predictivo para el caso de $V_{m\acute{a}x}$ en función de las variables del diseño (tabla IV.24.). Para el caso de los demás parámetros cinéticos ($t_{V_{m\acute{a}x}}$, $pH_{V_{m\acute{a}x}}$ y t_f) no se pudieron obtener modelos que establezcan una relación con las variables del diseño. En un estudio realizado por Damín y col. (2009) se ha visto que la suplementación con WPC, LPD y caseinato de sodio no influyó sobre el tiempo para alcanzar la tasa de acidificación máxima.

Tabla IV.24. Coeficientes de regresión del modelo polinomial de segundo orden para $V_{m\acute{a}x}$ y estadísticos obtenidos a partir del análisis ANOVA del modelo para las leches fermentadas probióticas con colesterol reducido obtenidas para el caso de estudio 2.

<i>Factores</i>	$V_{m\acute{a}x}$
C	0,012
X_1	$-3,24 \cdot 10^{-3***}$
X_2	$-5,63 \cdot 10^{-4}$
$X_1 \cdot X_2$	$9,97 \cdot 10^{-4*}$
X_1^2	$1,69 \cdot 10^{-3*}$
X_2^2	
<i>Estadísticos</i>	
R^2	0,9662
R^2 -ajustado	0,9392
valor-F	35,74
Falta de ajuste (p-valor)	0,8399

Significancia: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

A partir del análisis estadístico (tabla IV.24.), se observa que el valor de F para el modelo cuadrático reducido obtenido para $V_{m\acute{a}x}$ implica que el mismo es significativo ($p < 0,001$). El valor-p de la prueba de la falta de ajuste indica que la misma es no significativa respecto al error puro ($p > 0,05$), lo cual es adecuado. Los coeficientes de determinación R^2 y R^2 -ajustado están por encima de 0,9, por lo tanto el modelo ajusta muy adecuadamente a los datos experimentales.

A partir de los coeficientes de los términos lineales se observó que X_1 (CAL) resultó altamente significativo para la respuesta estudiada, mientras que X_2 (CAS) fue no significativa, sin embargo, para obtener un modelo jerárquico se decidió agregarla al modelo final. Ambas variables influyen de modo negativo sobre $V_{m\acute{a}x}$. Por otro lado, la significancia de la interacción entre ambas variables $X_1.X_2$ indica que la magnitud del aumento o disminución de CAL dependió de la concentración de CAS considerada. El término cuadrático, X_1^2 , resultó también significativo para el modelo obtenido y al ser positivo curva la superficie de respuesta “hacia arriba”. En la figura IV.35. puede observarse como el incremento en el contenido de CAL disminuye significativamente el valor de $V_{m\acute{a}x}$.

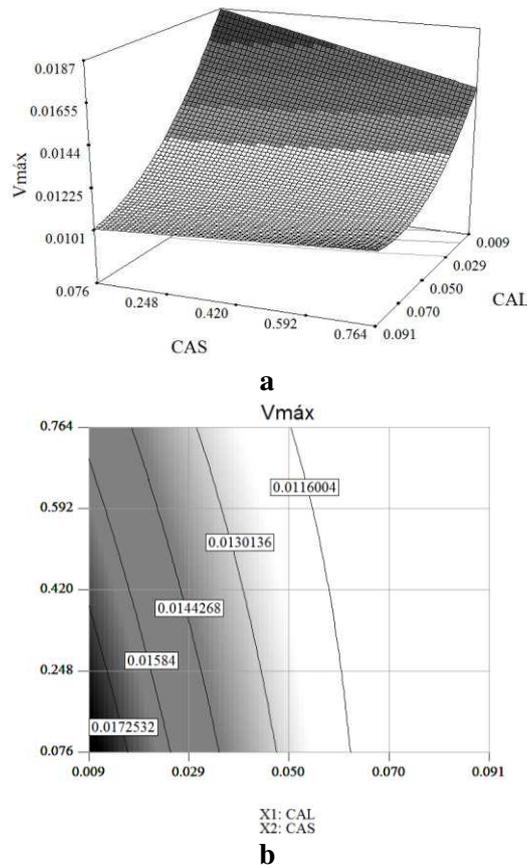


Figura IV.35. Gráficas de superficie de respuesta (a) y líneas de contorno (b) para $V_{m\acute{a}x}$, en función de la concentración de CAL y CAS, para el caso de estudio 2.

La disminución de la tasa de acidificación a mayores valores de CAL (principalmente) y CAS puede tener varios fundamentos. Pirkul y col. (1997) reportaron que la adición de calcio al yogur provoca que la acidez sea menor (y por lo tanto el pH mayor), por el efecto amortiguador del calcio sobre las bacterias ácido lácticas, ya que las bacterias producen menor cantidad de ácido debido a la presencia de calcio y al mismo carácter químico de este elemento. El incremento de la capacidad buffer se traduce en que se requiere desarrollo ácido adicional por los starters, para alcanzar un pH similar. Por su parte, Ronegard y Dejmet (1993) postularon que el calcio se asocia con las micelas de caseína y provoca que las bacterias no se sigan reproduciendo consecuencia que ocasiona que la acidez sea menor en sistemas adicionados con calcio.

Por otro lado, si bien la proporción LPD:WPC adicionada no fue significativa por sí sola pero si mediante la interacción con CAL, se observó que la mayor proporción de LPD:WPC (es decir mayor contenido CAS) disminuye la máxima velocidad de acidificación (principalmente a bajas concentraciones de CAL). Estos resultados concuerdan con los hallados por (Marafon y col., 2011), quienes obtuvieron velocidades máximas de acidificación cuando se suplementó leche con WPC en comparación con las leches suplementadas con LPD. La mayor concentración de CAS implica una menor concentración de proteínas de suero (menor WPC). Estas últimas, han demostrado tener un efecto promotor de la acidificación, debido a que el tratamiento térmico enérgico libera a partir de ellas aminoácidos y péptidos, de comportamiento estimulante del crecimiento de las bacterias acidolácticas del fermento acidificante. Por ende, la mayor proporción de CAS (mayor relación LPD/WPC), disminuye la velocidad de acidificación.

Salaun y col. (2005) postularon que la sustitución parcial de LPD por WPC aumenta la capacidad buffer a pH 4 y la disminuye entre pH 5 y 6 (como sucede en este caso, recordando que el pH de corte de la fermentación es 5). Estas modificaciones se encuentran relacionadas a las diferencias en la capacidad amortiguadora entre WPC y LPD quienes tienen máxima capacidad amortiguadora cerca de pH 4 y entre pH 5 y 6, respectivamente.

IV.3.2. ANÁLISIS DE LA VARIACIÓN DEL pH Y ACIDEZ TITULABLE DURANTE LA VIDA ÚTIL.

La tabla IV.25. muestra los valores medios de pH y acidez obtenidos durante el almacenamiento de las diferentes leches fermentadas probióticas con colesterol reducido, para el caso de estudio 2. Adicionalmente, se observan los porcentajes de variación (%V) entre fin e inicio de vida útil para ambos parámetros.

En todas las muestras analizadas se observó una disminución del pH en función del tiempo de almacenamiento. El pH promedio de todas las muestras obtenido al inicio del almacenamiento (día 3) fue $4,713 \pm 0,173$ y al final de la vida útil (día 31) fue $4,285 \pm 0,084$. Las figuras IV.36. y IV.37. representan los valores de pH y acidez respectivamente, durante la vida de anaquel (días 3, 10, 17, 24 y 31).

La muestra que presentó mayor pH y menor acidez al día 3 y 31 fue la 5 (máxima concentración de CAL y máxima de CAS); en cambio la muestra que presentó menor pH y mayor acidez, al inicio y al final del almacenamiento fue la muestra 6 (mínima concentración de CAL y máxima de CAS). Observando los datos obtenidos, nuevamente se vio el efecto tampón del CAL, ya reportado anteriormente durante la cinética de fermentación. La concentración de caseína parece no tener significancia como también ocurrió anteriormente.

Durante el almacenamiento de las leches fermentadas se produjo un descenso de pH y aumento de acidez, tal como se esperaba, pero no se pudo establecer una relación estadísticamente significativa entre las variables del diseño y estos parámetros durante la vida útil del producto. Las diferencias observadas entre las muestras con respecto a este parámetro podrían tener que ver con factores externos que afectan al pH y resultan difíciles de estandarizar, tales como la velocidad de enfriamiento una vez finalizada la fermentación, y la temperatura de conservación (Tamime y Robinson, 1999).

Generalmente las variaciones porcentuales del pH durante la vida útil fueron menores al 10% para todas las muestras; en el caso de la acidez fue más dispersa (entre 10-50%).

Tabla IV.25. Valores medios de pH y acidez (mol/L ácido láctico) y porcentaje de variación de los mismos (V%) durante el almacenamiento de las diferentes experiencias de leches fermentadas probióticas con colesterol reducido, para el caso de estudio 2.

Exp. N°	pH en el almacenamiento						Acidez en el almacenamiento					
	Días					V% pH	Días					V% Ac
	3	10	17	24	31		3	10	17	24	31	
1	4,65	4,41	4,26	4,24	4,23	8,93	0,1137	0,1326	0,1311	0,1372	0,1380	21,46
2	4,66	4,39	4,30	4,37	4,36	6,55	0,1031	0,1155	0,1249	0,1266	0,1249	12,43
3	4,71	4,53	4,33	4,34	4,32	8,29	0,1081	0,1173	0,1254	0,1344	0,1369	26,62
4	4,79	4,64	4,50	4,63	4,34	9,32	0,0990	0,1031	0,1188	0,1163	0,1285	29,84
5	5,14	4,77	4,63	4,45	4,42	14,01	0,0811	0,1014	0,1175	0,1260	0,1211	49,22
6	4,54	4,43	4,29	4,21	4,15	8,52	0,1149	0,1279	0,1357	0,1387	0,1446	25,87
7	4,61	4,43	4,35	4,31	4,24	7,93	0,1138	0,1144	0,1279	0,1347	0,1269	11,54
8	4,64	4,33	4,23	4,26	4,21	9,37	0,1143	0,1261	0,1284	0,1353	0,1394	21,91
9	4,67	4,42	4,34	4,30	4,30	8,03	0,0988	0,1135	0,1219	0,1207	0,1240	25,52
10	4,54	4,41	4,30	4,18	4,18	9,20	0,1033	0,1125	0,1229	0,1345	0,1405	36,01

Los errores estándares fueron menores al 5%.

$$V\%pH = (pH_{\text{día 31}} - pH_{\text{día 3}}) / (pH_{\text{día 3}}) * 100$$

$$V\%Ac = (Acidez_{\text{día 31}} - Acidez_{\text{día 3}}) / (Acidez_{\text{día 3}}) * 100$$

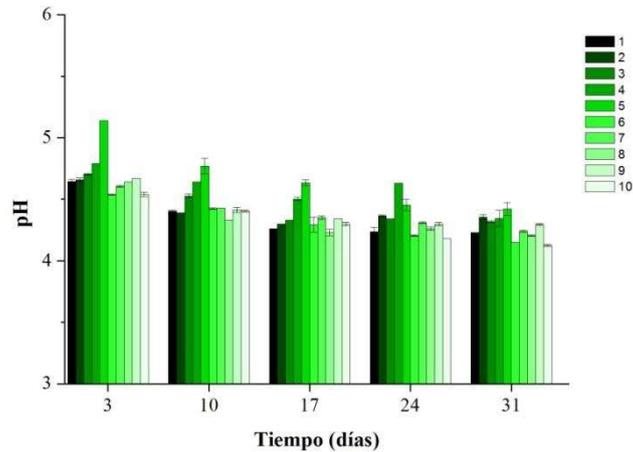


Figura V.36. Evolución del pH durante el almacenamiento para las diferentes muestras correspondientes al caso de estudio 2.

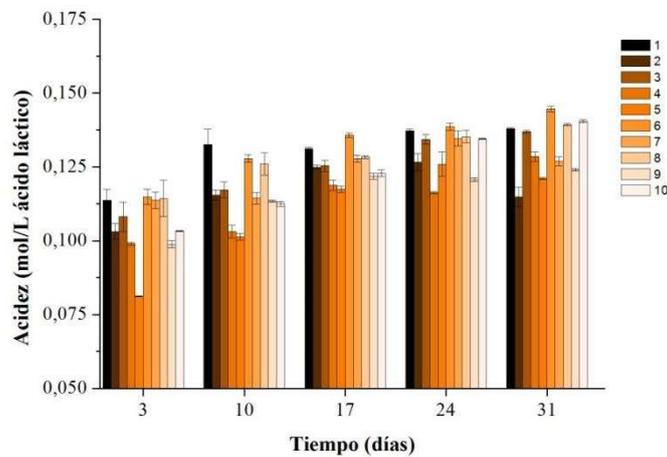


Figura IV.37. Evolución de la acidez titulable (mol/L ácido láctico) durante el almacenamiento para las diferentes muestras correspondientes al caso de estudio 2.

El desarrollo de estos parámetros a lo largo del almacenamiento muestra el incremento esperado en acidez (postacidificación), y la consiguiente disminución del pH para todas las formulaciones debido a que, los microorganismos “iniciadores” quedan viables y, por consiguiente, con metabolismo activo aunque disminuido debido al efecto de la baja temperatura durante la refrigeración (Gonzales-Martínez y col., 2002). Estos parámetros logran estabilizarse hacia el fin de la vida útil.

IV.3.3. ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA.

Se obtuvo la composición química promedio de cada una de las muestras de leches fermentadas al día 17 de almacenamiento (mitad vida útil), tal como se observa en la tabla IV.26.

En el caso de los sólidos totales, el valor máximo fue 26,75% (muestra 5) y el mínimo 24,13% (muestra 8), similares a los valores teóricos calculados por balance de masas (ver Anexo I). Para las cenizas el rango de variación fue entre 0,96% y 1,23%, observándose que aquellas muestras con mayor contenido de calcio en su formulación poseen el mayor contenido de cenizas, tal como era de esperarse. El contenido promedio de proteínas totales fue $4,23 \pm 0,25\%$, valor ubicado dentro del teórico calculado por balance de masas (ver anexo I). En este sentido, si bien se varió la proporción LPD/WPC, la cantidad de proteína total no varía entre ambas materias primas (35% aproximadamente). Los valores de grasa teóricos esperados (3,43 - 3,49%, ver anexo I) son superiores al promedio calculado aquí entre las muestras ($2,76 \pm 0,08\%$).

El promedio de hidratos de carbono fue $17,41\% \pm 0,75$ (calculado por diferencia).

Tabla IV.26. Composición química promedio (% m/m) de las diferentes experiencias al día 17 de almacenamiento, para el caso de estudio 2.

Exp. N°	% Cenizas	% Grasa	% Proteína total	% Hidratos de Carbono	% Sólidos totales	% Humedad
1	1,07	2,80	4,15	16,52	24,54	75,46
2	1,08	2,80	4,22	17,52	25,62	74,38
3	1,13	2,70	4,35	17,89	26,07	73,93
4	1,01	2,50	4,38	18,00	25,89	74,11
5	1,23	3,20	4,13	18,19	26,75	73,25
6	0,98	2,70	4,07	17,52	25,26	74,74
7	1,12	2,90	4,25	17,18	25,45	74,55
8	1,16	2,60	4,30	16,07	24,13	75,87
9	0,96	2,70	4,32	17,79	25,77	74,23
10	1,09	2,60	4,40	16,34	24,43	75,57

Los errores estándares fueron menores al 5%.

En la figura IV.38. se esquematiza, a través de un gráfico circular, la composición química porcentual de la muestra 1.

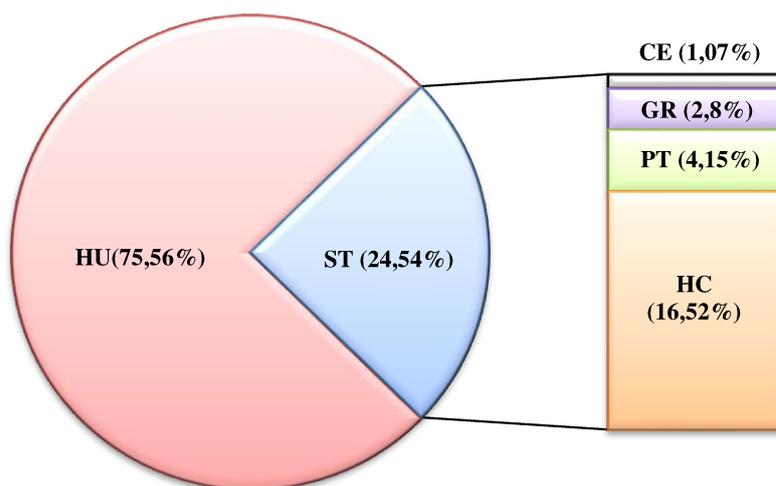


Figura IV.38. Gráfico de la composición porcentual promedio para la muestra 1, correspondiente al caso de estudio 2. HU: humedad, ST: sólidos totales, CE: cenizas, GR: grasas, PT: proteína total, HC: hidratos de carbono.

IV.3.4. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ACUOSA.

En la tabla IV.27., se observa que todas las muestras poseen una elevada actividad acuosa (a_w), con valores promedio que oscilan entre $0,968 \pm 0,007$.

Tabla IV.27. Actividad acuosa (a_w) promedio de todas las experiencias al día 17 de almacenamiento para todas las experiencias correspondientes al caso de estudio 2.

Exp. N°	Actividad Acuosa (a_w)	Temperatura (°C)
1	0,973	24,8
2	0,971	23,3
3	0,957	23,4
4	0,973	25,2
5	0,973	24,5
6	0,953	24,8
7	0,971	24,8
8	0,973	24,2
9	0,971	23,8
10	0,970	24,1

Los errores estándares fueron menores al 5%.

Estos valores muy elevados permiten potenciar el desarrollo de los microorganismos agregados, acidificantes y probióticos, favoreciendo su viabilidad. No se observaron variaciones significativas en los valores de a_w entre las diferentes muestras, por lo tanto se concluye que las variables estudiadas no tienen influencia en este parámetro.

IV.3.5. ANÁLISIS DE LA RETENCIÓN DE AGUA.

IV.3.5.1. Determinación del índice de retención de agua por acción de la gravedad.

En la tabla IV.28. se expresan los valores promedios de índice de retención de agua por gravedad (% IRA_g) de las leches fermentadas, correspondientes al caso de estudio 2, durante el almacenamiento (días 3, 17 y 31).

Tabla IV.28. IRA% promedio por acción de la gravedad para las muestras durante el almacenamiento (3, 17 y 31 días) para el caso de estudio 2.

Exp. Nº	Días		
	3	17	31
1	100	100	100
2	100	100	100
3	100	100	100
4	100	100	100
5	100	100	100
6	100	100	100
7	100	100	100
8	100	100	100
9	100	100	100
10	100	100	100

Ninguna muestra presentó desprendimiento de suero a lo largo del almacenamiento, lo cual describe una altísima estabilidad del producto, respecto al desuerado (sinéresis), semejando el comportamiento del producto en góndola.

IV.3.5.2. Determinación del índice de retención de agua por centrifugación.

La tabla IV.29. muestra los promedios obtenidos para el índice de retención de agua por centrifugación (% IRA_c). En general, el desprendimiento de suero fue despreciable a lo largo de la vida útil, observándose valores generalmente dentro del rango 99,961 ± 0,002%.

Al analizar los resultados, observamos que todas las muestras presentaron un IRA % mayor a 99,96%, muy elevado, que reafirma lo mencionado en cuanto a la muy elevada estabilidad del coágulo, incluso en condiciones aceleradas o potenciadas, para desuerar.

Tabla IV.29. IRA% promedio por centrifugación para las muestras durante el almacenamiento (3,17 y 31 días) para el caso de estudio 2.

Exp. N°	Días		
	3	17	31
1	100	99,99	99,73
2	99,67	100	100
3	99,99	99,99	100
4	100	100	99,99
5	100	100	99,99
6	100	100	100
7	100	99,99	100
8	100	99,99	99,99
9	100	99,99	99,99
10	99,99	99,98	99,98

Los errores estándares fueron menores al 5%.

Tradicionalmente en la producción de leches fermentadas, el contenido de sólidos de la leche es incrementado mediante el agregado de leche en polvo descremada (LPD) y/o concentrado de proteínas de suero (WPC) (Damin y col., 2009). En el presente trabajo, las muestras de leches fermentadas obtenidas no presentaron variaciones significativas en el IRA % con respecto a la composición de CAL y CAS durante el almacenamiento y también fueron independientes del método utilizado (por gravedad o centrifugación). El IRA % se mantuvo por encima de 99,96 % para todas las muestras y durante la vida útil, lo cual indica una gran estabilidad de la matriz, que no produce sinéresis. Además, los hidrocoloides empleados en la formulación (gelatina, almidón modificado y goma espina corona) también estarían influyendo en la capacidad de retener agua por parte de la matriz, como se vio anteriormente en el caso de estudio 1.

En estudios anteriores, se ha demostrado que la mayor capacidad de retener agua se obtuvo para los yogures elaborados con leches enriquecidas con LPD o con mezclas de WPC y caseinato. El alto contenido de extracto seco en la leche fortificada con LPD y WPC podría explicar la mayor capacidad de retener agua en yogures. Además, el pretratamiento térmico realizado antes de la fermentación contribuye a una mayor retención de agua, ya que esto podría estar relacionado con una mayor solvatación de la micela y una microestructura más ramificada, menos susceptible a la pérdida de agua cuando se somete a las fuerzas centrífugas o gravitacionales. Otra explicación puede deberse a que el yogur fortificado con WPC contiene una cantidad relativamente alta de proteínas de suero con carga positiva y por lo tanto, tiene una mayor capacidad de retener agua (Remeuf y col. 2003).

Pocos estudios hay en relación al agregado de calcio en yogures y el efecto en la retención de agua, pero en uno de ellos realizado por Gurmeet y Kasiviswanathan (2008), se pudo observar que las mediciones de capacidad de retención de agua, mostraron diferencias significativas entre las muestras de yogur fortificadas con calcio (utilizando lactato de calcio) y un yogur control (sin calcio agregado), donde se vio que la capacidad de retención de agua más alta se obtuvo para las muestras de yogur fortificadas con calcio. La baja capacidad de retención de agua o separación del suero se relaciona con una red de gel inestable y excesivos reordenamientos de una red de gel débil. El aumento del contenido de calcio del yogur resultó en un aumento de fosfato de calcio coloidal (CCP) y la vinculación entre las micelas de caseína, y por lo tanto, una red más intensa de los geles.

IV.3.6. RECUESTO DE MICROORGANISMO PROBIÓTICO.

En la tabla IV.30. y figura IV.39., se muestra el recuento promedio del microorganismo probiótico utilizado (*L. rhamnosus* Sp1), para las distintas experiencias del caso de estudio 2, en función del almacenamiento (a los 3 y 31 días).

Tabla IV.30. Recuento de *Lactobacillus rhamnosus* Sp1 (logUFC.g⁻¹) y variación porcentual (V%) durante el almacenamiento para las muestras de leches fermentadas probióticas con colesterol reducido, para el caso de estudio 2.

Exp. N°	Días		V%
	3	31	
1	7,47	7,73	3,59
2	7,61	7,88	3,58
3	7,52	6,45	14,28
4	7,62	6,82	10,51
5	8,11	6,60	18,60
6	7,37	7,08	3,99
7	7,93	8,40	6,00
8	7,26	7,80	7,48
9	7,78	6,98	10,16
10	7,86	6,54	16,78

El recuento promedio obtenido de UFC.g⁻¹ para los días 3 y 31 de almacenamiento a 5°C, fue de $2,37 \cdot 10^7$ y $5,88 \cdot 10^7$ UFC.g⁻¹, respectivamente. Es decir, todas las experiencias superaron la sugerencia mínima de 10^6 UFC/mL de la FAO-OMS (2001) y FUFOSÉ “Funcional Food Science in Europe” (Ciencia de los Alimentos Funcionales en Europa) (2004) (Ashwell, 2004). Además, están contenidas dentro de la clasificación

de *alimento con probiótico* del CAA. El nivel mínimo aconsejable de células viables en productos lácteos, consumidos regularmente para obtener un efecto probiótico en el consumidor, va desde 10^5 - 10^6 UFC.g⁻¹ con una ingesta semanal aconsejada de 300 a 400 g, hasta 10^7 - 10^8 UFC.g⁻¹ con un consumo diario de al menos 100 g (Reinheimer y Zalazar, 2006).

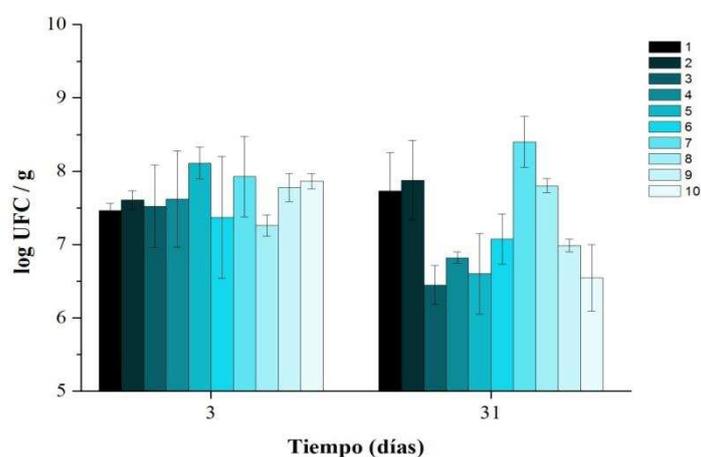


Figura IV.39. Gráfica del Log UFC.g⁻¹ de *L. rhamnosus* Sp1 vs. tiempo (días 3 y 31) para las diferentes muestras correspondientes al caso de estudio 2.

El almacenamiento relativamente largo de los productos lácteos refrigerados puede obstaculizar gravemente la supervivencia de las cepas probióticas. La supervivencia es, por supuesto, esencial para los organismos destinados a poblar el intestino humano, uno de los temas más importantes en la provisión de salud y beneficios de las bacterias probióticas. En el caso de productos que contienen probióticos, la presencia de un número adecuado de bacterias vivas al final de la vida útil es aún más importante porque es la esencia de la promoción de la salud (German, 1999). Si bien no se observó influencia de las variables en estudio sobre el recuento de microorganismo, el recuento a día 31 fue más bajo comparado con el caso de estudio 1, lo que también se vio reflejado en la variación porcentual, que en algunos casos superó el 10%, siendo la muestra 5 (máximo CAL y CAS), aquella en la cual el recuento disminuyó más de un orden logarítmico durante el almacenamiento. Por su parte, la experiencia 2 fue la que menos variación sufrió (3,58%).

IV.3.7. ANÁLISIS DE LA REOMETRÍA DESTRUCTIVA CON VISCOSÍMETRO DE CILINDROS CONCÉNTRICOS.

IV.3.7.1. Reogramas de esfuerzo de corte (τ) en función del gradiente de deformación ($\dot{\gamma}$).

Mediante las curvas de flujo obtenidas para cada experimento y empleando los modelos de *Casson Modificado* y *Herschel y Bulkley* (ec. 4 y 5) se obtuvieron los parámetros reológicos de interés: *índice de consistencia superior* (K_s) e *inferior* (K_i) y el *índice de comportamiento superior* (n_s) e *inferior* (n_i) durante la vida útil de los productos a los 3 y 31 días posteriores a la elaboración (tabla IV.31.). Adicionalmente, se calculó la *viscosidad aparente a gradiente de deformación* 50 s^{-1} (μ_{ap50}) y el *índice de tixotropía* (IT) como el área comprendida entre las curvas del reograma.

Los datos experimentales ajustaron muy bien al modelo de Herschell-Bulkley con R^2 generalmente $> 0,96$ para ambos tiempos de ensayo.

Por otro lado, en la tabla IV.32. se pueden observar los coeficientes de los términos para los modelos hallados de las respuestas estudiadas, en función de las variables del diseño codificadas, junto con los estadísticos que describen el análisis ANOVA realizado.

IV.3.7.1.1. Análisis de las curvas de flujo superiores (gradientes de deformación crecientes).

Los valores de K_s a los 3 días de almacenamiento ($K_{s3días}$) varían entre 1,47 y 4,12 Pa.sⁿ, correspondientes a la experiencia 4 (mínimos niveles de CAL y CAS) y a la muestra 5 (máximos niveles de ambas variables), respectivamente, mientras que a los 31 días los valores fueron 2,08 y 4,71 Pa.sⁿ, para esas mismas muestras. Tal como se esperaba, se produjo un aumento en los valores de K_s durante el almacenamiento, siendo las variaciones porcentuales entre el 10 y 42% aproximadamente, corroborándose que aquellas muestras con mayor contenido de CAL presentaron la menor variación en el tiempo, lográndose de esta manera una mayor estabilidad en la firmeza del coágulo.

Tabla IV.31. Valores promedios estimados de los parámetros reológicos: K superior (K_s), K inferior (K_i), n superior (n_s) y n inferior (n_i), viscosidad aparente a gradiente de deformación 50 s^{-1} (μ_{ap50}) e índice de tixotropía (IT) y variación porcentual (V%) de cada uno, para los diferentes reogramas obtenidos a partir de las experiencias del caso de estudio 2, a los 3 y 31 días de almacenamiento. ^a: curva ascendente; ^b: curva descendente; R^2 : coeficiente de determinación obtenido de la modelo de Herschel y Bulckey. [K] = Pa.sⁿ; [n] = adimensional; [IT] = Pa.s⁻¹, [μ_{ap50}] = mPa.s. (Los errores estándares fueron menores al 5%).

Día	Parámetros	Experiencia N°									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
3	K_s^a	2,093	1,948	2,779	1,471	4,123	1,758	2,335	3,016	1,665	2,227
	n_s^a	0,600	0,672	0,63	0,689	0,522	0,689	0,645	0,519	0,672	0,610
	R^2	0,979	0,977	0,966	0,964	0,99	0,988	0,989	0,992	0,943	0,962
31	K_s^a	2,565	2,374	3,140	2,088	4,716	2,184	2,813	3,737	2,301	2,453
	n_s^a	0,639	0,642	0,572	0,625	0,466	0,651	0,625	0,518	0,641	0,628
	R^2	0,989	0,971	0,995	0,968	0,998	0,993	0,961	0,998	0,977	0,974
V%	K_s	22,55	21,87	12,99	41,94	14,38	24,23	20,47	23,91	38,20	10,51
	n_s	6,50	4,46	9,21	9,29	10,73	5,52	3,10	0,19	4,61	2,95
3	K_i^b	1,171	1,092	1,792	1,005	3,191	1,074	1,306	2,544	1,041	1,200
	n_i^b	0,798	0,825	0,752	0,836	0,663	0,859	0,806	0,725	0,866	0,788
	R^2	0,966	0,962	0,983	0,956	0,997	0,961	0,966	0,987	0,94	0,982
31	K_i^b	1,296	1,205	1,52	1,102	3,062	1,174	1,376	2,78	1,117	1,349
	n_i^b	0,805	0,830	0,804	0,818	0,691	0,815	0,794	0,748	0,812	0,821
	R^2	0,978	0,974	0,978	0,967	0,998	0,978	0,972	0,995	0,963	0,981
V%	K_i	10,77	10,45	14,89	9,76	4,07	9,82	6,17	9,45	7,20	12,42
	n_i	0,88	0,61	6,91	2,15	4,22	5,12	1,49	3,17	6,24	4,19
3	μ_{ap50}	1174,8	1107,4	1520,8	1230,6	1853,3	998,3	1024,8	1720,3	1030,4	1204,4
31		1298,1	1272	1560,7	1262,8	2041,6	1071,9	1083,2	1894	1235,8	1336,2
V%		10,50	14,86	2,62	2,62	10,16	7,37	5,70	10,10	19,93	10,94
3	IT	2610,2	1980,6	4089,6	2874,1	4299,9	2304,9	2083,5	4198,7	2521,8	2501,5
31		3789,4	2570,5	4390,8	3079,4	6421,3	2657,1	2492,9	5906,6	2847,9	3624,1
V%		45,18	29,78	7,37	7,14	49,34	15,28	19,65	40,68	12,93	44,88

Tabla IV.32. Coeficientes de regresión del modelo polinomial de segundo orden para K_s , n_s , K_i , n_i , μ_{ap50} e IT (utilizando las variables del diseño codificadas) y estadísticos obtenidos a partir del análisis ANOVA de cada modelo, para el día 3 y 31 de almacenamiento de las leches fermentadas probióticas con colesterol reducido obtenidas para el caso de estudio 2.

Factores	Día 3						Día 31					
	K_s	n_s	K_i	n_i	μ_{ap50}	IT	K_s	n_s	K_i	n_i	μ_{ap50}	IT
C	2,15	0,60	1,21	0,80	1127,8	2293,9	2,55	0,63	1,31	0,81	1274,4	3119,2
X_1	0,84***	-0,063***	0,73***	-0,07***	305,8***	814,5***	0,84***	-0,06***	0,66**	-0,034***	320,9***	1355,7**
X_2	0,34**	-0,023*	0,28**	-0,014*	2,9		0,35**	-0,016**	0,30*	-0,025***	16,8	255,1
$X_1 \cdot X_2$	0,26*	-0,027*	0,34**	-0,028*	141,2*		0,37**	-0,033***	0,37*	-0,028***	167,9*	613,2*
$(X_1)^2$	0,32*		0,56*	-0,021*	264,4*	1087,5***	0,48**	-0,055***	0,49*	-0,031***	263,7*	1097,9*
$(X_2)^2$		0,041*										
Estadísticos												
R^2	0,9646	0,9491	0,9789	0,9707	0,9677	0,9352	0,9824	0,9931	0,9349	0,9814	0,9315	0,8968
R^2 -ajust.	0,9363	0,9084	0,9619	0,9473	0,9419	0,9167	0,9682	0,9875	0,8828	0,9665	0,8766	0,8142
valor-F	34,07	23,32	57,88	41,41	37,44	50,49	69,58	178,73	17,95	65,82	16,99	10,86
Falta de ajuste (p-valor)	0,3143	0,2465	0,4127	0,3216	0,1900	0,2079	0,3538	0,6858	0,1030	0,8367	0,1561	0,1296

Significancia: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

Para ambos días se obtuvieron modelos muy adecuados (R^2 y R^2 -ajustado $> 0,90$) y significativos ($p < 0,001$) que permitieron predecir el comportamiento de K_s en función de las variables analizadas (tabla IV.32.). La falta de ajuste resultó ser no significativa ($p > 0,05$). Los términos lineales X_1 (para CAL) y X_2 (para CAS) resultaron positivos y significativos, siendo el primero de ellos el de mayor significancia. Por otro lado, resultó significativa la interacción entre ambas variables $X_1.X_2$ y el término cuadrático X_1^2 correspondiente al CAL. Esto significa que al aumentar la concentración de ambas variables, se genera un producto con mayor consistencia y mayor viscosidad, con una estructura más firme ($>K$), posiblemente por una mayor asociación entre las moléculas de CAS con el CAL adicionado. Este comportamiento se puede observar en las gráficas de superficie de respuesta y líneas de contorno para $K_{s\text{día}3}$ en función de la concentración de CAL y CAS (figura IV.40.).

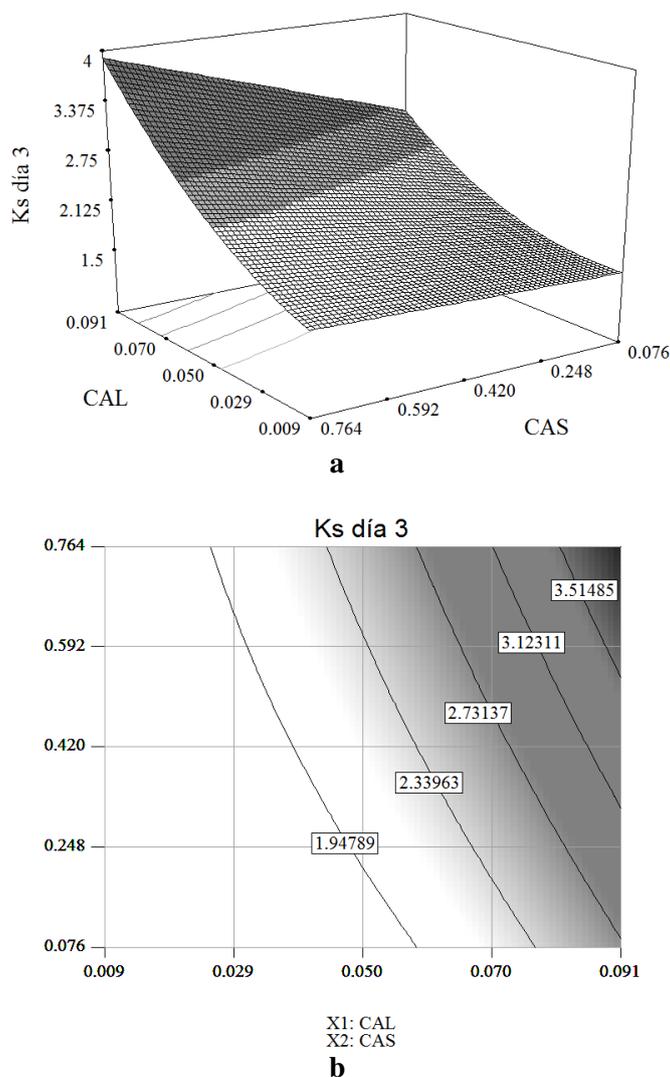


Figura IV.40. Gráficas de superficie de respuesta (a) y líneas de contorno (b) para $K_{s\text{día}3}$ en función de la concentración de CAL y CAS, para el caso de estudio 2.

Se puede observar la mayor dependencia de la consistencia ($K_{s\text{día}3}$) con respecto a la variable CAL, logrando maximizar dicho parámetro a las mayores concentraciones de CAL y CAS testeadas. Por otro lado, en ausencia de CAL agregado, no se observaron diferencias en los valores de $K_{s\text{día}3}$ cualquiera sea la concentración de CAS en el rango testado (zona blanca), por lo cual se concluye que existe una fuerte interacción entre ambas variables, lo cual se refleja en el término interactivo del modelo. Como se describió anteriormente, la misma dependencia con las variables se observó para $K_{s\text{día}31}$.

El índice de comportamiento de la curva superior del reograma al día 3 de almacenamiento ($n_{s\text{día}3}$), osciló entre 0,51 (muestra 8, máximo CAL e intermedio de CAS) y 0,68 (muestra 4, mínimo de ambas variables), es decir que todas las muestras presentaron un comportamiento no newtoniano ($n < 1$), no existiendo proporcionalidad constante entre el esfuerzo de corte (τ) y el gradiente de deformación ($\dot{\gamma}$) y, por ende, la viscosidad depende del gradiente ($\dot{\gamma}$) a la que se evalúe. En general, aquellas muestras con máxima concentración de CAL son las que presentaron menor $n_{s\text{día}3}$, sucediendo lo contrario para aquellas con mínimo nivel de este mineral. A los 31 días posteriores a la elaboración de las leches fermentadas, $n_{s\text{día}31}$ varió entre 0,46 y 0,65 para las muestras 5 (máximos niveles de ambas variables) y 6 (mínimo de CAL y máximo de CAS), respectivamente. Generalmente, las variaciones porcentuales de este parámetro fueron menores al 10% durante la vida útil, observando una disminución de los valores de n_s hacia fin de vida útil (tabla IV.31.).

El análisis ANOVA realizado para las respuestas $n_{s\text{día}3}$ y $n_{s\text{día}31}$ arrojó modelos que ajustaron adecuadamente los datos experimentales para ambas respuestas, siendo altamente significativos. En ambos casos, X_1 resultó ser el término de mayor significancia, indicando que el CAL influye de manera inversa sobre el índice de comportamiento tanto al día 3 como al 31, esto significa que al aumentar el contenido de CAL en la matriz n_s disminuye, alejándose del comportamiento newtoniano ($n = 1$). La CAS se comportó de igual manera que CAL disminuyendo el valor de n al aumentar la concentración de la misma, es decir aumentando el contenido de LPD (y por lo tanto disminuyendo WPC). Además, la interacción de ambas variables ($X_1.X_2$) resultó significativa para ambos tiempos de ensayo por lo tanto, la respuesta entre los niveles de CAL no es la misma en todos los niveles de CAS. A concentraciones intermedias de CAS (0,4%, aproximadamente), la disminución de n_s requirió menores incrementos en la concentración de CAL en comparación con el caso de utilizar bajas concentraciones

de CAS (menores a 0,2%, por ejemplo). Específicamente, X_2^2 resultó significativo a día 3, mientras que X_1^2 para el día 31. A modo de ejemplo, la figura IV.41. muestra lo explicado anteriormente para $n_{sdía3}$.

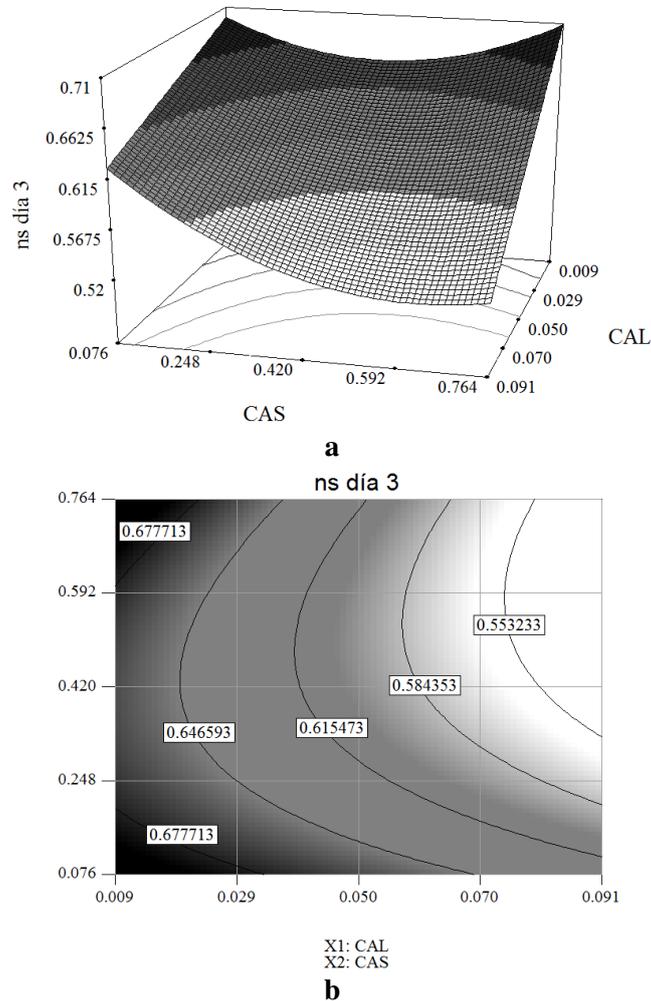


Figura IV.41. Gráficas de superficie de respuesta (a) y líneas de contorno (b) para $n_{sdía3}$ en función de la concentración de CAL y CAS, para el caso de estudio 2.

IV.3.7.1.2. *Análisis de las curvas de flujo inferiores (gradientes de deformación decrecientes).*

El índice de consistencia obtenido de la curva inferior del reograma al día 3 de almacenamiento ($K_{idía3}$) presentó valores entre 1 y 3,19 Pa.sⁿ para las muestras 4 (mínimo nivel de CAL y CAS) y 5 (máximo de CAL y máximo de CAS), respectivamente (tabla IV.31.), observando la misma tendencia de aumento de este valor en función de la concentración de ambas variables, como ocurrió para $K_{sdía3}$. Durante el almacenamiento, generalmente se observó un incremento (10% promedio) en el valores

de $K_{idía31}$, siendo nuevamente las muestras 4 y 5 las de máximo y mínimo valor en dicha respuesta (1,1 y 3,06 Pa.sⁿ, respectivamente).

Los modelos de predicción hallados para $K_{idía3}$ y $K_{idía31}$ resultaron significativos para un 99% de confianza. Analizando los coeficientes de determinación (R^2) los mismos explican en más de un 90% la variabilidad de los datos experimentales. Por otro lado, la falta de ajuste resultó no significativa ($p > 0,05$). Al igual que para K_s , la variable CAL fue la de mayor influencia para ambas respuestas, aumentando el valor de la respuesta al aumentar el valor de la misma. CAS también resultó significativa, aunque su influencia fue menor (tabla IV.32.). Por lo tanto, al aumentar la concentración de CAL y CAS, se produce un producto más firme y consistente.

Los valores $n_{idía3}$ presentaron variaciones entre 0,663 y 0,865, correspondiendo a las muestras 5 y 4, respectivamente. Asimismo se vio un comportamiento similar para el día 31 de almacenamiento ya que el valor mínimo de $n_{idía31}$ fue 0,691 y el máximo 0,83 corresponden a las muestras 5 y 2, respectivamente (tabla IV.31.).

La variación porcentual de n_i durante el almacenamiento fue menor al 10%, lo que permite destacar el comportamiento estable de los sistemas.

Analizando los modelos obtenidos para $n_{idía30}$ y $n_{idía31}$, en ambos casos se observó la dependencia inversa de n_i respecto del CAL (principalmente) y CAS ($R^2 > 0,96$ en ambos casos y $p < 0,01$) (tabla IV.32.).

A modo de resumen, en las curvas descendentes (a gradientes de deformación decreciente) se evidencia la alteración (disrupción) de la red proteica que conforma el gel de las leches fermentadas. Se debe tener en cuenta este cambio en la firmeza y viscosidad de los productos luego de un tratamiento mecánico prolongado (como ocurre durante el transporte por cañerías, bombeo, agitación, etc.) para que el gel conserve la estructura deseada en el producto final, ya envasado.

En la bibliografía consultada se encontró que el agregado de sales de calcio mejora la viscosidad y consistencia del producto, debido a la formación de uniones cruzadas entre el fosfato de calcio con las micelas de caseína (Coşkub y Şenoğlu, 2011).

Por otra parte, Sady y col. (2009) encontraron que el agregado de suplementos (leche en polvo descremada (LPD), WPC o mezclas de ambas) aumenta los sólidos totales lo que deriva en un aumento de la viscosidad aparente, comparado con un control sin el agregado de los mismos. Asimismo vieron que el agregado de LPD y/o

WPC generó un aumento en el umbral de fluencia (yield stress, τ_0) y además, todas las muestras presentaron un comportamiento No Newtoniano ($n < 1$). Marafon y col. (2011) observaron que los yogures formulados con LPD tenían estructuras más fuertes y rígidas comparadas con aquellos suplementados con mezclas de LDP/WPC ó WPC sólo.

IV.3.7.1.3. Análisis de la viscosidad aparente a gradiente de deformación 50 s^{-1} .

Las viscosidades aparentes a gradiente de deformación 50 s^{-1} (μ_{ap50}) variaron en promedio entre 1000 y 2000 mPa.s aproximadamente en el rango de formulaciones utilizadas a los 3 y 31 días de almacenamiento, encontrándose los valores mínimos para la experiencia 6 (mínimo CAL y máxima CAS) y experiencia 5 (máximo CAL y máxima CAS). Los valores se incrementaron en general en menos de 10% durante la vida útil (tabla IV.31.).

Se obtuvieron modelos matemáticos muy adecuados y significativos que permitieron predecir la relación de μ_{ap50} para ambos tiempos ensayados. En ambos casos, CAL (X_1) resultó ser altamente significativo para las respuestas estudiadas ($\mu_{ap50\text{día}3}$ y $\mu_{ap50\text{día}31}$), mientras que la CAS (X_2) no tuvo influencia estadísticamente significativa ($p > 0,1$ para el término lineal). Sin embargo, la significancia de la interacción entre ambas variables $X_1.X_2$ hizo que se considere el término lineal X_2 en la ecuación para mantener la jerarquía del modelo. Por su parte, X_1^2 también resultó significativo.

Las gráficas de superficie de respuesta y líneas de contorno (figura IV.42.) permiten observar que aumentando la concentración de CAL, el valor de $\mu_{ap50\text{día}3}$ también aumenta. En cambio, al aumentar CAS, el valor de $\mu_{ap50\text{día}3}$ puede disminuir o incrementarse, dependiendo si se trabaja a bajas o altas concentraciones de CAL, respectivamente. De esta manera, se ve la significancia de la interacción entre ambos factores. Para un mejor entendimiento se expone la IV.43. Como puede verse, la curva negra representa los valores de la respuesta ($\mu_{ap50\text{día}3}$) cuando la concentración de CAS es baja, mientras que la curva roja es para las concentraciones de CAS elevadas, trabajando CAL en el rango estudiado. Así, manteniendo CAL en baja concentración, $\mu_{ap50\text{día}3}$ es menor cuando la formulación tiene alta concentración de CAS comparada con la de baja CAS, ocurriendo lo contrario cuando se trabaja a altas concentraciones de CAL. Esto resulta lógico desde el punto de vista que a bajos valores de CAL, la

respuesta disminuye cuando CAS aumenta, posiblemente por una limitación por falta de CAL y exceso de CAS para generar las interacciones entre las micelas.

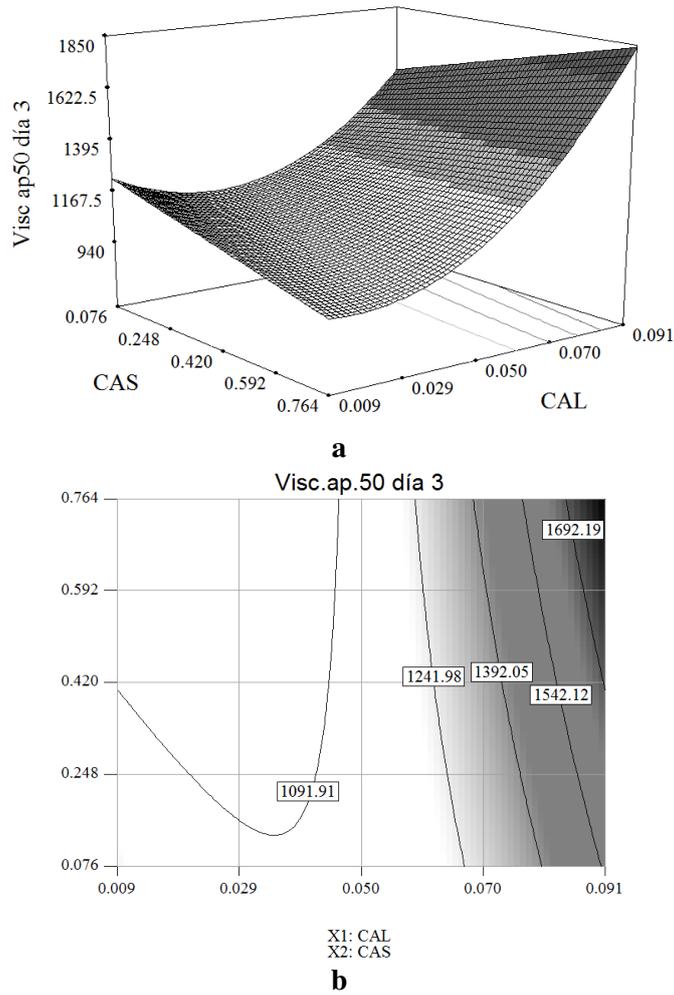


Figura IV.42. Gráficas de superficie de respuesta (a) y líneas de contorno (b) para $\mu_{ap50día3}$, en función de la concentración de CAL y CAS, para el caso de estudio 2.

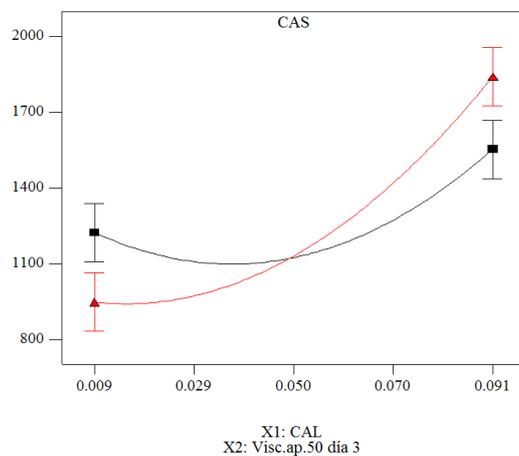


Figura IV.43. Efecto de interacción entre factores CAL y CAS sobre $\mu_{ap50día3}$, para el caso de estudio 2. Negro: 0,076% CAS; rojo: 0,764% CAS.

Martinez y col (2003) reportaron que los yogures enriquecidos con WPC y LPD tenían diferentes comportamientos durante la fermentación, y el gel formado fue diferente en términos de viscosidad y el nivel de sinéresis. Los yogures enriquecidos con LPD tuvieron mayor viscosidad y sinéresis comparada con aquellos suplementados con WPC. En nuestro trabajo se observó la misma tendencia de incremento de viscosidad en función del aumento de LPD, sin embargo no se evidenció diferencias en el desuerado (sinéresis) posiblemente por la utilización de otros aditivos como los hidrocoloides (G, AMM y GEC) en proporciones constantes que tienen capacidad para retener agua.

IV.3.7.2. Análisis del índice de tixotropía.

Se determinaron las áreas de histéresis (estimadas como índice de tixotropía: IT) a partir de las curvas de flujo para las muestras de leches fermentadas probióticas con colesterol reducido obtenidas para el caso de estudio 2 (tabla IV.31). En la figura IV.44. se muestran los reogramas típicos de las muestras que contienen en su formulación concentraciones máximas de CAL y CAS (muestra 5) y mínimas de ambas variables (muestra 4), a principio y fin de vida útil.

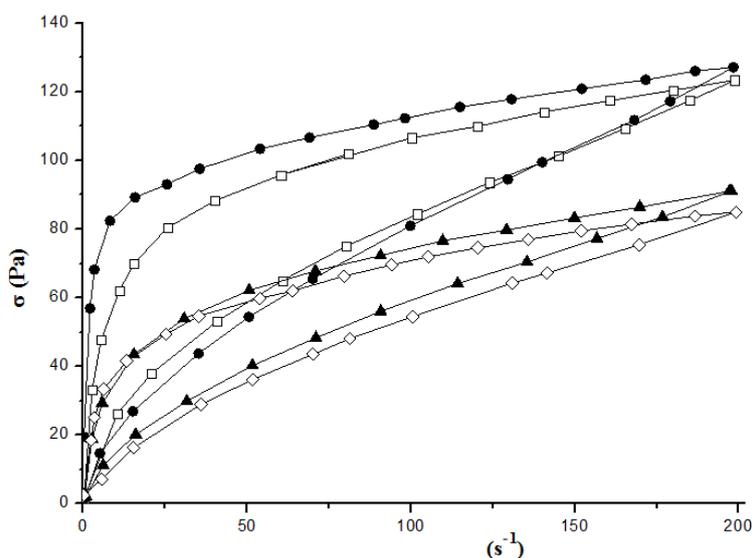


Figura IV.44. Reograma de esfuerzo de corte (τ) en función del gradiente de deformación (γ') correspondiente a las muestras 4 y 5 durante el almacenamiento, para el caso de estudio 2. (●) muestra 5 día 31, (□) muestra 5 día 3, (◇) muestra 4 día 3 y (▲) muestra 4 día 31.

A los 3 días de almacenamiento los valores del índice de tixotropía ($IT_{día3}$) oscilaron entre 1980,6 y 4299,9 Pa.s⁻¹, correspondientes a las experiencias 2 (intermedio CAL y

mínima CAS) y 5 (máximo CAL y CAS), respectivamente. Los valores de IT se incrementaron a fin de vida útil, variando desde $2492,9 \text{ Pa}\cdot\text{s}^{-1}$ (experiencia 7) a $6421,3 \text{ Pa}\cdot\text{s}^{-1}$ (experiencia 5). La variación porcentual entre ambos tiempos de ensayo fue máxima para la muestra 5 (alrededor de 50%) y mínima para la muestra 4 (alrededor de 7%) (tabla IV.31.).

Tanto para $IT_{\text{día3}}$ como $IT_{\text{día31}}$ se obtuvieron modelos predictivos significativos que ajustaron adecuadamente. En el caso de $IT_{\text{día3}}$ los términos X_1 y X_1^2 resultaron altamente significativos, indicando que el aumento en el contenido de CAL resultó en mayores áreas de histéresis (mayor IT); mientras que para el modelo para $IT_{\text{día31}}$ la interacción $X_1.X_2$ también resultó significativa. Este efecto de la interacción se puede ver comparando las gráficas de superficie de respuesta para $IT_{\text{día3}}$ e $IT_{\text{día31}}$. Para el caso de $IT_{\text{día31}}$, a mayor concentración del mineral mayor es el valor de IT , independientemente de la concentración de CAS adicionada a la matriz (figura IV.45.a). En cambio, para $IT_{\text{día3}}$ si se mantiene alta la concentración de calcio y la relación LPD:WPC va en aumento, $IT_{\text{día3}}$ aumenta, en cambio a bajas concentraciones de CAL y aumentando la relación LPD:WPC, $IT_{\text{día3}}$ disminuye (figura IV.45.b.).

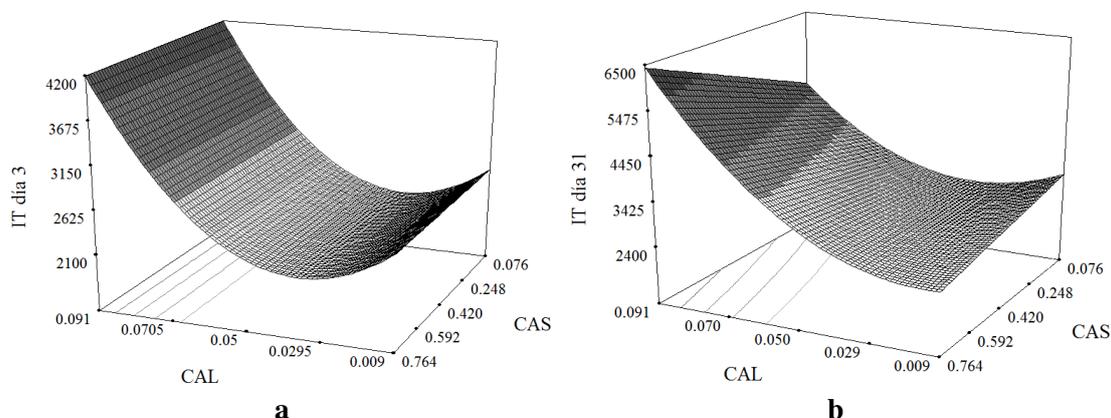


Figura IV.45. Gráficas de superficie de respuesta para $IT_{\text{día3}}$ (a) e $IT_{\text{día31}}$ (b) en función de la concentración de CAL y CAS, para el caso de estudio 2.

IV.3.6.2. Variación del esfuerzo de corte (τ) en función del tiempo de cizallamiento (t).

La tabla IV.33. muestra los valores de la resistencia inicial del coágulo (A) y velocidad de destrucción estructural (B) para cada experimento, a los 3 y 31 días de vida

útil, con los respectivos coeficientes de determinación R^2 (obtenidos a partir de la linealización del modelo de Weltmann modificado) y las variaciones porcentuales de cada parámetro en la vida útil. Como puede observarse el Modelo de Weltmann modificado ajustó muy bien a los datos experimentales ($R^2 > 0,98$).

La experiencia 5 (con máximos niveles de CAL y CAS) presentó mayor A y B al día 3 de vida útil. Los valores mínimos de A se hallaron en la muestra 6 (mínimo CAL, máxima CAS) al día 3 y muestra 4 (mínimo de ambas variables) a los 31 días. En el caso de B los valores mínimos fueron para la muestra 7 (intermedio CAL y máxima CAS) a los 3 y 31 días de almacenamiento, respectivamente y al día 31 fue máximo para la muestra 8 (máximo CAL, intermedio CAS). Se observó un incremento de los valores de dichos parámetros durante la vida de anaquel. Las variaciones porcentuales fueron diversas en ambos casos, siendo generalmente menores al 20% para el caso de A (excepción muestra 6), y entre 0,1 y 50% en el caso de B .

Tabla IV.33. Valores promedios estimados de los parámetros reológicos: *resistencia máxima inicial (A), velocidad de ruptura estructural (B)* y variación porcentual (V%) de cada uno, para las experiencias del caso de estudio 2, a los 3 y 31 días de almacenamiento. R^2 : coeficiente de determinación obtenido para el modelo de Weltmann. $[A] = \text{Pa.s}$; $[B] = \text{Pa.s}$.

Exp. N°	Día 3			Día 31			V%A	V%B
	A	-B	R^2	A	-B	R^2		
1	1480	104,8	0,9879	1499,4	116,4	0,9902	1,31	11,07
2	1374,5	58,7	0,9880	1394,6	70,2	0,9909	1,46	19,59
3	1556,7	111,8	0,9952	1770,8	134,2	0,9865	13,75	20,10
4	1258,4	83,5	0,9943	1273,7	90,1	0,9823	1,22	7,96
5	1955,5	143,7	0,9953	2378,3	196,3	0,9915	21,62	36,68
6	1100,8	61,2	0,9833	1904,9	76,5	0,9859	73,05	24,95
7	1674,8	45,1	0,9598	2020,4	66,6	0,9817	20,64	47,70
8	1770	160,6	0,9794	1845,9	178,9	0,9931	4,29	11,39
9	1350,6	137,7	0,9973	1405,8	143	0,9956	4,09	3,88
10	1420	110	0,9720	1542,8	109,8	0,9850	8,65	0,18

Los errores estándares fueron menores a 5%.

La figura IV.46. muestra las curvas de esfuerzo de corte (τ) en función del tiempo de cizallamiento para las muestras 4 y 5 a los 3 y 31 días posteriores de la elaboración de las leches fermentadas.

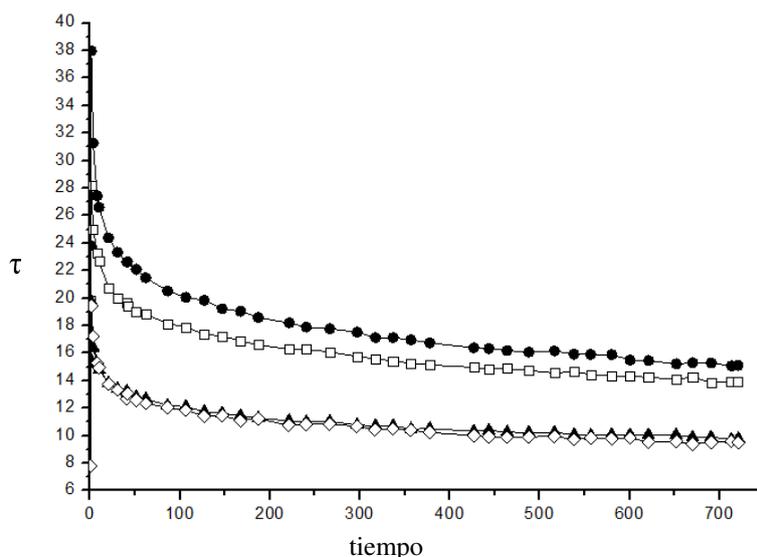


Figura IV.46. Reograma de esfuerzo de corte (τ , Pa) en función del tiempo de cizallamiento (s) para las muestras 4 y 5 en función del almacenamiento, correspondientes al caso de estudio 2. (\blacktriangle): muestra 4 día 3; (\square): muestra 5 día 3; (\diamond): muestra 4 día 31; (\bullet): muestra 5 día 31.

Para ambos parámetros se obtuvieron modelos significativos y que ajustaron adecuadamente a los valores experimentales, en ambos tiempos de ensayo. La falta de ajuste fue no significativa en todos los casos ($p > 0,05$) (tabla IV.34.).

Tabla IV.34. Coeficientes de regresión del modelo polinomial de segundo orden para *A*, *B*, (utilizando las variables del diseño codificadas) y estadísticos obtenidos a partir del análisis ANOVA de cada modelo, para el día 3 y 31 de almacenamiento de las leches fermentadas probióticas sin colesterol obtenidas para el caso de estudio 2.

Factores	Día 3		Día 31	
	A	B	A	B
C	1493,9	105,6	1515,5	117,8
X ₁	261,9 ^{***}	22,3 ^{**}	235,1 ^{***}	33,3 ^{**}
X ₂	90,4 [*]	-0,6	310,7 ^{***}	7,5
X ₁ .X ₂	139,1 [*]	13,5 [*]		18,9 [*]
(X ₁) ²		45,4 ^{**}	115,9 ^{***}	52,5 ^{**}
(X ₂) ²		-51,8 ^{**}	197,6 ^{***}	-40,1 [*]
Estadísticos				
R ²	0,9339	0,9635	0,9981	0,9437
R ² -ajust.	0,9008	0,9179	0,9966	0,8734
valor-F	28,24	21,12	660,7	13,42
Falta de ajuste (p-valor)	0,3603	0,2094	0,8682	0,1840

Significancia: ^{*} $p \leq 0,05$; ^{**} $p \leq 0,01$; ^{***} $p \leq 0,001$.

Particularmente, $A_{\text{día}3}$ dependió directamente de ambas variables, siendo mayor la influencia y significancia del término lineal X_1 (CAL). La interacción $X_1.X_2$ fue significativa. Hacia el fin de la vida de anaquel, $A_{\text{día}31}$ estuvo influenciada por los términos X_1 , X_2 , X_1^2 y X_2^2 , siendo los cuatro términos altamente significativos. Las gráficas de superficie de respuesta y líneas de contorno para $A_{\text{día}3}$ y $A_{\text{día}31}$ están representadas en la figura IV.47. Allí se puede ver la diferencia entre ambos modelos obtenidos, obteniéndose la gráfica correspondiente a un plano en el caso de $A_{\text{día}3}$ debido a la ausencia de términos cuadráticos en el modelo. La interacción se ve representada, observando que cuando se mantiene por ejemplo CAL en su valor mínimo (0,009%), la $A_{\text{día}3}$ disminuye a medida que aumenta la concentración de CAS (es decir, aumentado la relación LPD:WPC), ocurriendo lo contrario cuando CAL se mantiene en su valor máximo (0,091%) (figura IV.48.a).

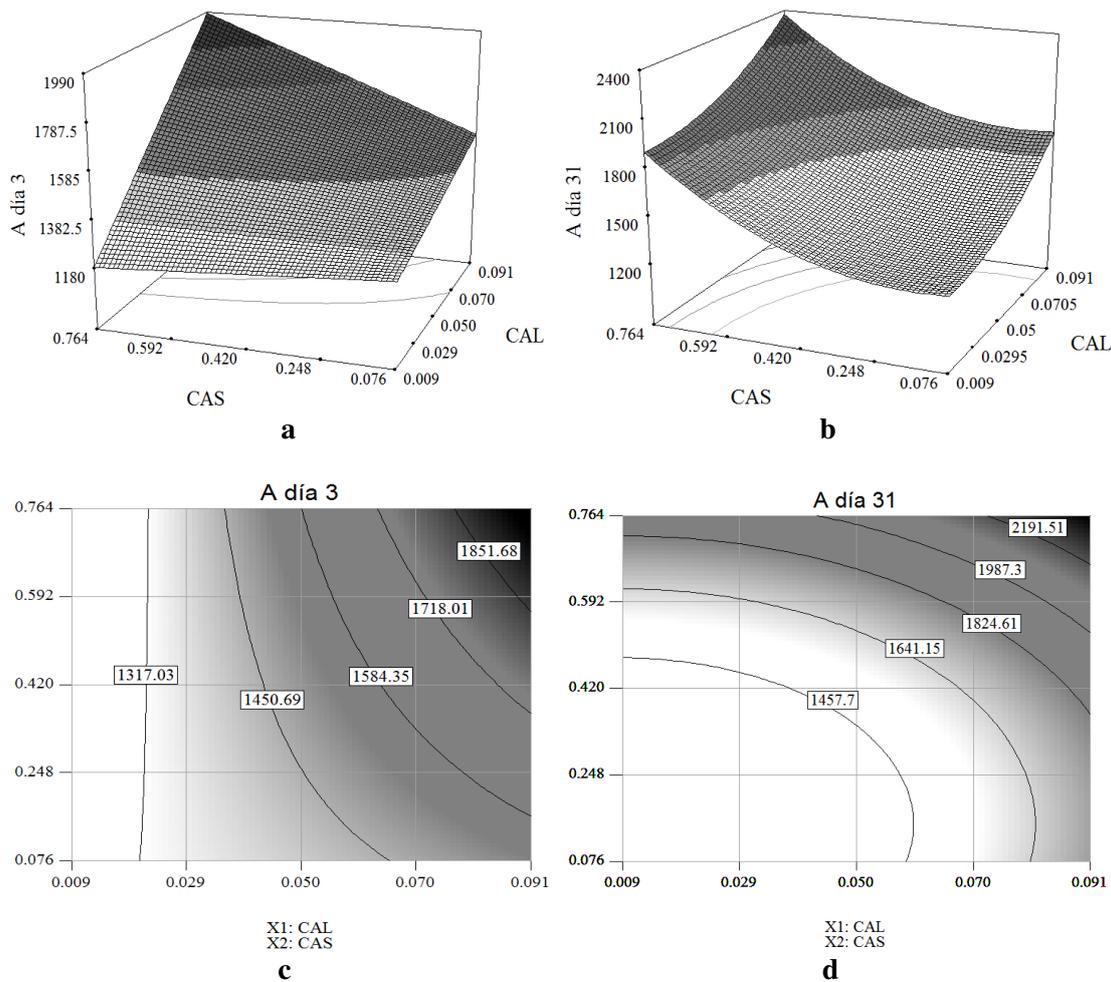


Figura IV.47. Gráficas de superficie de respuesta y líneas de contorno para $A_{\text{día}3}$ (a y c) y $A_{\text{día}31}$ (b y d) en función de la concentración de CAL y CAS, para el caso de estudio 2.

En cambio, $A_{día31}$ siempre aumenta al aumentar el contenido de ambas variables, independientemente del valor que tome cada una (figura IV.48.b). Por otro lado, la superficie se encuentra curvada por la presencia de los términos cuadráticos en el modelo (figura IV.47.b). En este caso, no existe interacción entre las variables.

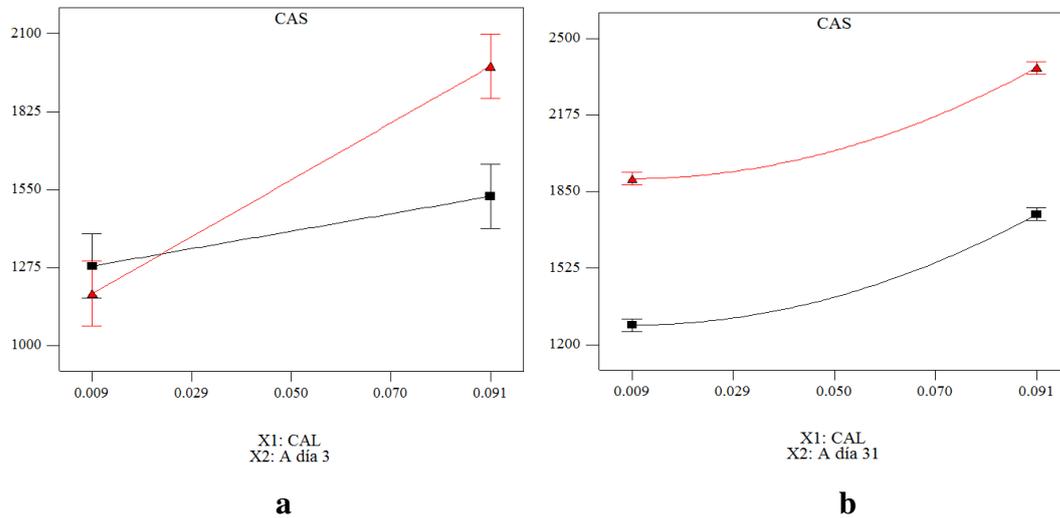


Figura IV.48. Efecto de interacción (a) y no interacción (b) entre variables para $A_{día3}$ y $A_{día31}$, respectivamente, para el caso de estudio 2. (En rojo: 0,764% CAS; en negro: 0,076% CAS).

En la tabla IV.34. se muestran los coeficientes de los términos de cada modelo hallado para $B_{día3}$ y $B_{día31}$. Con excepción de X_2 , los demás términos de la ecuación polinomial cuadrática resultaron significativos en ambos casos. Sin embargo, para que los modelos sean jerárquicos se incluyó X_2 en los mismos. Por lo tanto, al aumentar la concentración de CAL, existe una mayor destrucción de la estructura durante el tiempo de cizallamiento. A modo de ejemplo, las gráficas de superficie de respuesta y líneas de contorno para $B_{día3}$ se muestran en la figura IV.49. La significancia del término negativo X_2^2 hace que las gráficas de superficie de respuesta se curven “hacia abajo” sobre el eje de CAS, mientras que el término positivo X_1^2 hace que se curve “hacia arriba” sobre el eje del CAL. Esto genera una gráfica similar a una “silla de montar” propia de los paraboloides hiperbólicos. Los máximos valores de la respuesta se obtienen trabajando con elevada concentración de CAL e intermedia de CAS, mientras que los valores mínimos de $B_{día3}$ se obtienen cuando CAL está en concentración intermedia y CAS en máxima o mínima concentración. Gráficas similares se obtuvieron para $B_{día31}$.

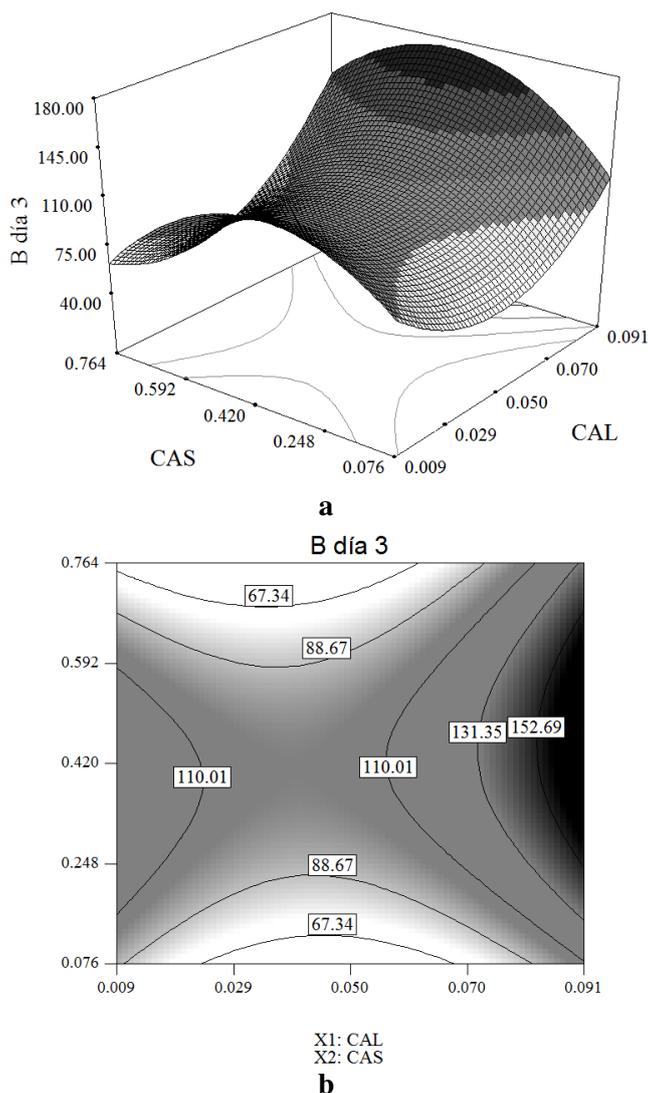


Figura IV.49. Gráficas de superficie de respuesta (a) y líneas de contorno (b) para $B_{\text{día 3}}$, en función de la concentración de CAL y CAS, para el caso de estudio 2.

En general, aumentando la concentración de CAL (principalmente) y la relación LPD:WPC se obtienen coágulos más firmes, con mayor resistencia a la ruptura inicial pero que luego se destruyen más rápidamente que aquellos con menor contenido de CAL y CAS. Estos resultados concuerdan con los hallados por Amatayakul y col. (2006), entre otros investigadores. Por su parte, se contradicen por lo hallado por Puvanenthiran y col. (2002), quienes encontraron que la fuerza del gel se ve incrementada con la disminución de la relación LPD:WPC. Esta diferencia en la firmeza o fuerza del gel entre este estudio y el de Puvanenthiran puede ser debido a diferencias en los tamaños de los agregados proteicos como resultado del calentamiento de las

leches a diferentes pH. Por lo tanto, los resultados de cada autor van a depender específicamente de las condiciones ensayadas y las concentraciones utilizadas.

Por otro lado, cuando se incrementa el contenido de CAL en leche, este aumento es distribuido entre la fase soluble y coloidal (Fox and Mc Sweeney, 1998; Gaucheron, 2005), lo que resulta en la transferencia de calcio a la fase micelar (fosfato de calcio coloidal). El aumento en fosfato de calcio coloidal incrementa la agregación de las micelas de caseína, dando lugar a un gel ácido más rígido de mayor viscosidad y firmeza.

IV.3.8. ANÁLISIS DEL PERFIL DE TEXTURA POR PENETROMETRÍA.

En la figura IV.50. se grafica la curva del perfil de textura al tercer día de almacenamiento para las muestras 5 (máximo de CAL y CAS) y 7 (máximo de CAS e intermedio de CAL). Al comparar las curvas de las dos muestras se puede afirmar que la muestra 5 presenta mayor dureza debido a que el pico del primer área positiva es mayor y que la muestra con máxima concentración de CAL mostró una adhesividad mayor ya que el área negativa es más grande que la de la muestra 7. Se aprecia, además, que el pico de la segunda área positiva es menor que la de la primera; esto se debe a que el material ya sufrió una deformación y no logra recuperar su estructura durante la segunda penetración.

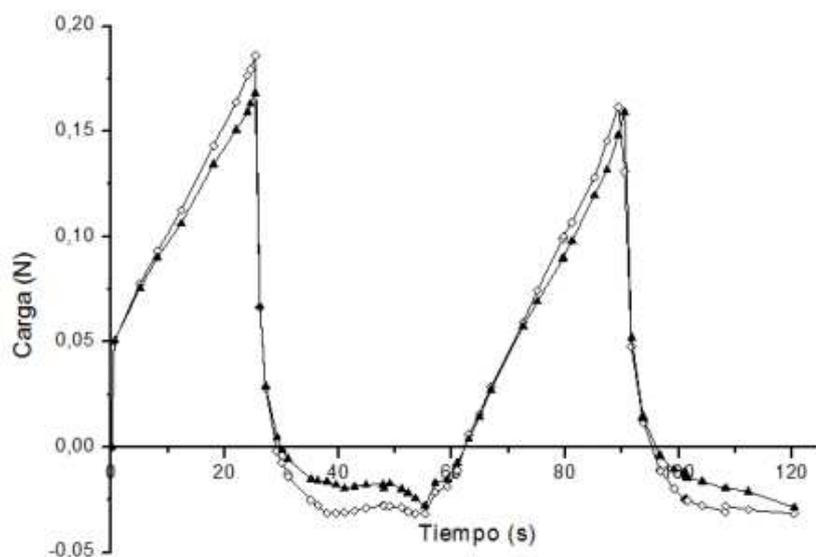


Figura IV.50. Curvas de Perfil de Textura obtenidas para las muestras 5 (◊) y 7(▲) al día 3 de almacenamiento, correspondiente al caso de estudio 2.

La tabla IV.35. muestra los valores medios obtenidos para los diferentes parámetros calculados a partir de los perfiles de textura (Fuerza vs. tiempo) para las diferentes leches fermentadas probióticas con colesterol reducido correspondientes al caso de estudio 2, a los 3 y 31 días de almacenamiento.

IV.3.8.1. Dureza.

Los valores promedios de *Dureza* a los 3 días de almacenamiento variaron entre 0,1621 y 0,1839 N, para las muestras 4 (mínimo de CAL y CAS) y 5 (máximo de ambas variables), respectivamente. La *Dureza* aumentó durante el almacenamiento, variando desde 0,1776 N (muestra 6: mínimo CAL y máxima CAS) a 0,3073 N (muestra 5), siendo el incremento entre las muestras entre 0,62 – 67%, aproximadamente (tabla IV.35).

Se obtuvieron modelos matemáticos significativos y que ajustaron adecuadamente (tabla IV.36.) para $Du_{día3}$ y $Du_{día31}$ al relacionar estas respuestas con las variables del diseño codificadas. Para el caso de $Du_{día3}$ sólo los términos lineales X_1 (CAL) y X_2 (CAS) resultaron significativos. En cambio, para $Du_{día31}$ todos los términos de la ecuación polinomial cuadrática fueron significativos, siendo los correspondientes a X_1 y X_1^2 los de mayor influencia. Del análisis de los coeficientes de las ecuaciones obtenidas, se infiere que durante el almacenamiento hay un aumento en el valor de los coeficientes, y por consiguiente, de la dureza, principalmente el coeficiente lineal para CAL (X_1), lo que demuestra un marcado efecto directo del calcio durante la vida útil. Las gráficas de superficie de respuesta y líneas de contorno para $Du_{día3}$ y $Du_{día31}$ en función de las variables se muestran en la figura IV.51. Allí se puede ver el efecto de ambas variables, casi actuando en la misma intensidad a los 3 días de almacenamiento, donde al aumentar la concentración de CAL y CAS (aumentando la relación LPD:WPC), la dureza aumenta. En cambio, a los 31 días de almacenamiento puede observarse la significancia de los términos cuadráticos (por las curvaturas de las gráficas) y de la interacción entre ambas variables. Estos resultados concuerdan con los encontrados por Lau y col. (2000), en los que se observaron que la adición de iones CAL aumenta la dureza de los geles. Se debe señalar, sin embargo, que la concentración de CAL que maximiza la dureza depende de otras variables, como las proporciones de los gelificantes utilizados, entre otras.

Tabla IV.35. Valores promedios estimados de los parámetros de perfil de textura por penetrometría: *Dureza (Du)*, *Adhesividad (Ad)*, *Elasticidad (El)*, *Cohesividad (Coh)*, *Gomosidad (Go)* y *Masticabilidad (Ma)* y variación porcentual (V%) de los mismos, estimados a partir de las curvas Fuerza vs. tiempo para las leches fermentadas probióticas con colesterol reducido del caso de estudio 2, a los 3 y 31 días de almacenamiento. [Du] = N, [Ad] = N.s⁻¹, [Go] = N; [Ma] = N

Parámetros	Experiencia N°									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>Du</i> _{día3}	0,1775	0,1685	0,1703	0,1621	0,1839	0,1765	0,1795	0,1795	0,1757	0,1698
<i>Du</i> _{día31}	0,2100	0,1841	0,2222	0,2160	0,3073	0,1776	0,1812	0,2957	0,2328	0,2085
V% _{Du}	18,31	9,26	30,48	33,25	67,10	0,62	0,95	64,74	32,50	22,79
<i>Ad</i> _{día3} ^a	0,9456	0,627	0,8513	0,6117	1,8492	1,2354	1,372	1,1701	0,9331	0,9661
<i>Ad</i> _{día31}	1,1159	0,7315	1,4226	0,5812	2,1656	1,1240	1,5020	0,7341	1,3040	0,9921
V% _{Ad}	18,01	16,67	67,11	4,99	17,11	9,02	9,48	37,26	39,75	2,69
<i>El</i> _{día3}	1,0078	1,0015	1,0010	1,0004	1,0002	1,0025	1,0025	1,0017	1,0064	1,0023
<i>El</i> _{día31}	1,0017	1,0001	1,0105	1,0067	1,0027	1,0018	1,0032	1,0017	1,0008	1,0001
V% _{El}	0,61	0,14	0,95	0,63	0,25	0,07	0,07	0,00	0,56	0,22
<i>Coh</i> _{día3}	0,7217	0,7708	0,7861	0,7690	0,8633	0,7496	0,7931	0,7743	0,7089	0,7351
<i>Coh</i> _{día31}	0,7419	0,7617	0,7913	0,7683	0,8721	0,7767	0,8056	0,7503	0,7145	0,7492
V% _{Coh}	2,80	1,18	0,66	0,09	1,02	3,62	1,58	3,10	0,79	1,92
<i>Go</i> _{día3}	0,1281	0,1299	0,1339	0,1247	0,1588	0,1323	0,1424	0,1390	0,1246	0,1248
<i>Go</i> _{día31}	0,1558	0,1402	0,1758	0,1659	0,2680	0,1379	0,1460	0,2219	0,1664	0,1562
V% _{Go}	21,62	7,95	31,34	33,09	68,81	4,23	2,56	59,66	33,60	25,15
<i>Ma</i> _{día3}	0,1281	0,1299	0,1339	0,1247	0,1588	0,1323	0,1424	0,1390	0,1246	0,1248
<i>Ma</i> _{día31}	0,1558	0,1402	0,1758	0,1659	0,2680	0,1379	0,1460	0,2219	0,1664	0,1562
V% _{Ma}	21,62	7,95	31,32	33,09	68,81	4,23	2,56	59,66	33,60	25,15

^a Valores absolutos. Los errores estándares fueron menores a 5%.

Tabla IV.36. Coeficientes de regresión del modelo polinomial de segundo orden para *Dureza (Du)*, *Adhesividad (Ad)*, *Cohesividad (Coh)*, *Gomosidad (Go)* y *Masticabilidad (Ma)* (utilizando las variables del diseño codificadas) y estadísticos obtenidos a partir del análisis ANOVA de cada modelo, para el día 3 y 31 de almacenamiento de las leches fermentadas probióticas con colesterol reducido obtenidas para el caso de estudio 2.

Factores	Día 3					Día 31				
	<i>Du</i>	<i>Ad</i>	<i>Coh</i>	<i>Go</i>	<i>Ma</i>	<i>Du</i>	<i>Ad</i>	<i>Coh</i>	<i>Go</i>	<i>Ma</i>
C	0,17	0,98	0,73	0,13	0,13	0,21	1,09	0,74	0,15	0,15
X₁	3,2.10 ^{-3**}	0,18 ^{**}	0,033 ^{***}	8,4.10 ^{-3***}	8,4.10 ^{-3***}	0,033 ^{***}	0,43 ^{***}	0,026 ^{**}	0,033 ^{***}	0,033 ^{***}
X₂	6,5.10 ^{-3**}	0,39 ^{***}	0,013 ^{**}	7,5.10 ^{-3***}	7,5.10 ^{-3***}	7,3.10 ^{-3*}	0,34 ^{***}	0,022 ^{**}	0,012 [*]	0,012 [*]
X₁.X₂		0,094 [*]	0,024 ^{***}	4,3.10 ^{-3*}	4,3.10 ^{-3*}	0,031 ^{**}		0,018 [*]	0,03 ^{**}	0,03 ^{**}
(X₁)²		0,13 [*]	0,011 [*]			0,051 ^{***}	0,22 ^{**}		0,039 ^{**}	0,039 ^{**}
(X₂)²			0,052 ^{***}	7,8.10 ^{-3**}	7,8.10 ^{-3**}	-0,031 ^{**}		0,057 ^{**}		
Estadísticos										
R²	0,8278	0,9795	0,9936	0,9566	0,9566	0,9854	0,9737	0,9504	0,9599	0,9599
R²-ajust.	0,7786	0,9631	0,9856	0,9219	0,9219	0,9671	0,9609	0,9107	0,9278	0,9278
valor-F	16,83	59,77	123,88	27,56	27,56	53,98	74,10	23,95	29,9	29,9
Falta de ajuste (p-valor)	0,9317	0,1364	0,9646	0,5013	0,5013	0,0827	0,6055	0,2649	0,1892	0,1892

Se puede afirmar que los resultados de Du del perfil de textura se correlacionan con las variables reológicas analizadas, ya que el CAL presenta una influencia directa sobre el índice de consistencia (K) e inversa sobre el índice de comportamiento (n), lo que se debe a las interacciones entre el CAL y las micelas de CAS, que aumentan la fuerza y viscosidad del gel. Estos datos también concuerdan con los hallados por Salvador y Fiszman (2004), que encontraron que la *dureza* de leches fermentadas aumenta al ser adicionadas con más LPD en lugar de WPC, durante el período de almacenamiento a 10 °C, 20 °C y 30 °C.

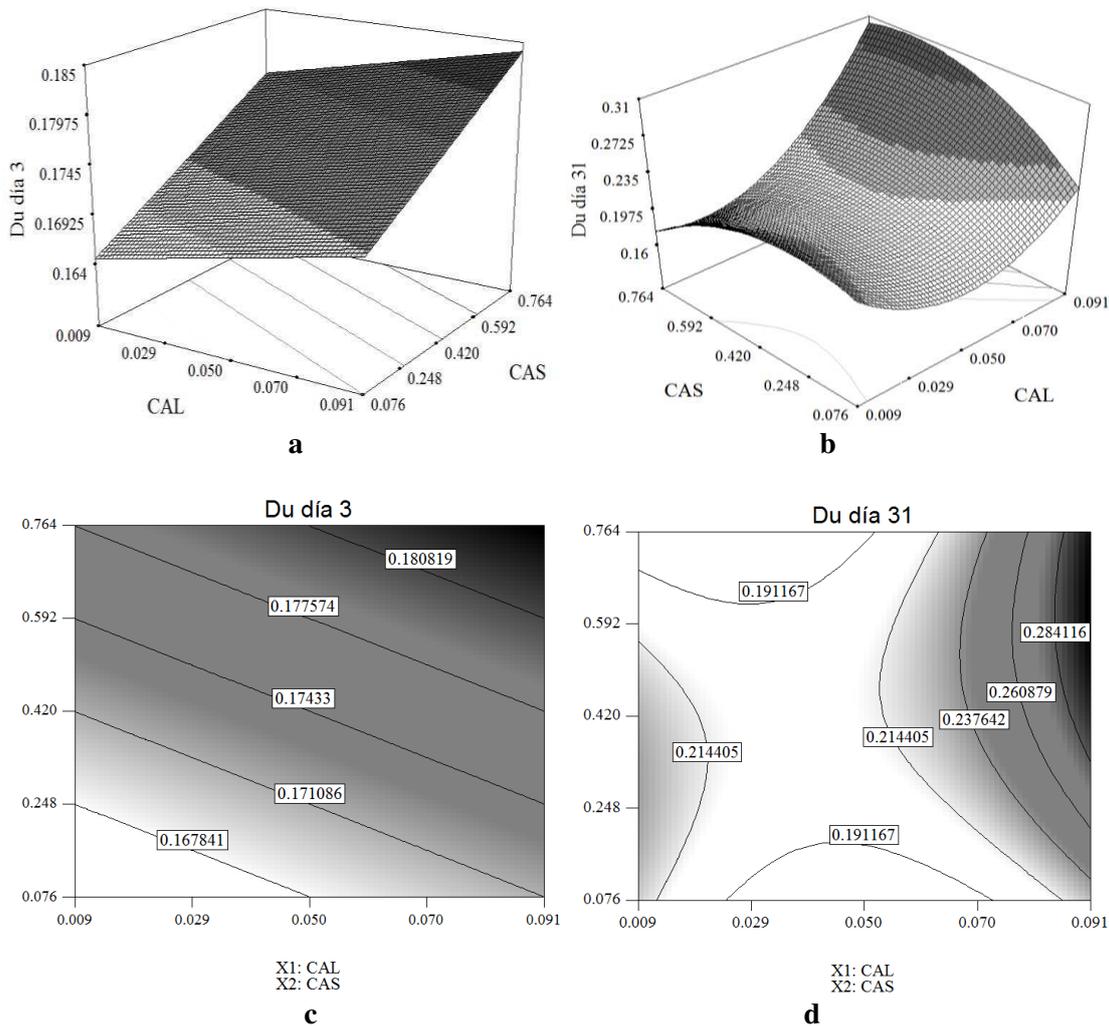


Figura IV.51. Gráficas de superficie de respuesta y líneas de contorno para Du_{dia3} (a y c) y Du_{dia31} (b y d) en función de la concentración de CAL y CAS, para el caso de estudio 2.

Por otra parte se informó que las proteínas de suero desnaturalizadas del WPC, aumentan la fuerza del gel ya que se integran completamente a la red proteica y le otorgan una mayor habilidad para reformarse (Sandoval-Castilla, 2004). De la misma

manera se comprobó que el aumento de la relación caseína/WP resulta en mayores valores de dureza. Otros autores, sin embargo, encontraron que la fuerza de los geles aumenta al disminuir la relación caseína/WPC. Esta diferencia de resultados puede deberse a que las condiciones de calentamiento y pH generan diferencias en el tamaño de las proteínas agregadas, como ya se explicó anteriormente (Amatayakul et al, 2006).

El aumento de la fuerza del gel en las muestras que contienen menos cantidad de WPC (es decir mayor CAS) podría explicarse por el aumento de la fuerza iónica en la fase líquida, lo que contribuiría a la reducción de la repulsión electrostática de la superficie micelar, favoreciendo la agregación de las micelas (Landge, 2009). Las interacciones entre las caseínas con las proteínas de suero podrían también contribuir a la reducción de la dureza del gel y la consistencia del producto en línea con el aumento de WPC. Algunos autores han descrito interacciones entre las proteínas de suero y κ -caseína, que hacen a las micelas menos sensibles a la disminución del pH y esto favorece su solvatación y no su agregación (Oldifield y col., 2000).

IV.3.8.2. Adhesividad.

Los valores absolutos de *Adhesividad* a los 3 días de almacenamiento mostraron un mínimo de $0,6270 \text{ N.s}^{-1}$ y un máximo de $1,8492 \text{ N.s}^{-1}$, valores correspondientes a las muestras 2 (intermedio CAL, mínima CAS) y 5 (máximo de ambas variables), como se aprecia en la tabla IV.35. A los 31 días de almacenamiento, se corroboró que esas mismas muestras presentaron nuevamente los valores mínimos y máximos, siendo $0,7315 \text{ N.s}^{-1}$ y $2,1656 \text{ N.s}^{-1}$, respectivamente. Al observar la evolución de *Ad* en el transcurso del almacenamiento, se concluye que aumenta, siendo los coeficientes de variación porcentuales entre 2,69 y 67,11%.

Considerando los modelos hallados para $Ad_{día3}$ y $Ad_{día31}$ tanto CAL como CAS influyen positivamente sobre las respuestas estudiadas. La diferencia radica que a día 3, CAS tiene mayor influencia y significancia sobre $Ad_{día3}$, mientras que al fin de vida útil ocurre lo contrario, siendo CAL la variable de mayor influencia sobre $Ad_{día31}$. Por lo tanto se requiere una mayor fuerza para remover el material adherido a la boca durante el consumo de aquellas leches fermentadas producidas con mayor contenido de CAL y CAS (mayor relación LPD/WPC). A modo de ejemplo, en la figura IV.52. se observa cómo el aumento de CAL y CAS provoca un aumento en $Ad_{día3}$.

En estudios previos, Sady y col. (2009) encontraron que el aumento en los sólidos totales de la leche genera un aumento en los valores de Ad , en particular la suplementación con LPD.

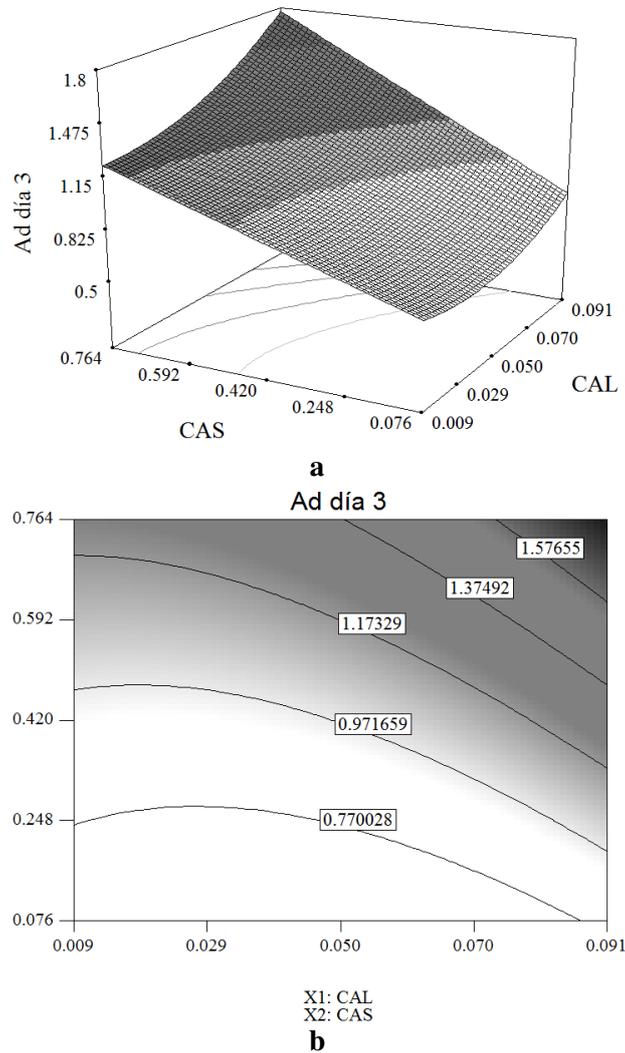


Figura IV.52. Gráficas de superficie de respuesta (a) y líneas de contorno (b) para $Ad_{día3}$ en función de la concentración de CAL y CAS, para el caso de estudio 2.

IV.3.8.3. Elasticidad.

La *Elasticidad* nos da una idea de la recuperación del alimento a su dimensión original una vez finalizada la fuerza deformante; esto es, a mayores valores de elasticidad mayor es la recuperación del alimento después de la deformación. La tabla IV.35. muestra los valores de este parámetro para las distintas formulaciones a los 3 y 31 días de almacenamiento. Como puede observarse, no hay variación significativa de los mismos entre las muestras durante el período de almacenamiento. El valor promedio de El obtenido fue de $1,0029 \pm 0,0028$.

Debido a la muy baja variación del parámetro entre las muestras, no se encontraron modelos que permitan ver el efecto de las variables. En la bibliografía consultada, existen trabajos que hallaron relaciones entre las variables de estudio y este parámetro. Lau y col. (2000) verificaron que pequeños aumentos de iones calcio disminuyen la elasticidad. Asimismo, Shimada y Cheftel (1989) mostraron que la adición de WPC resulta en un aumento de la elasticidad.

IV.3.8.4. Cohesividad.

En los ensayos realizados, la *Cohesividad* registró un rango de variación, entre 0,7089 (muestra 9: mínimo CAL e intermedio CAS) y 0,8633 (muestra 5) a los 3 días, incrementándose en menos del 5% hacia fin de vida útil, obteniendo valores de 0,7145 y 0,8721, para las mismas muestras hacia el fin de vida útil (tabla IV.35.).

Se obtuvieron modelos significativos y adecuados para ambos días de ensayo (tabla IV.36.), observando que la *Coh* aumentó al incrementar el contenido de CAL y CAS en las muestras, tal como muestra la figura IV.53. para $Coh_{día3}$. En la bibliografía consultada se halló que la cohesividad de geles que tienen diferentes gelificantes disminuye al agregar iones calcio (Lau, 2000).

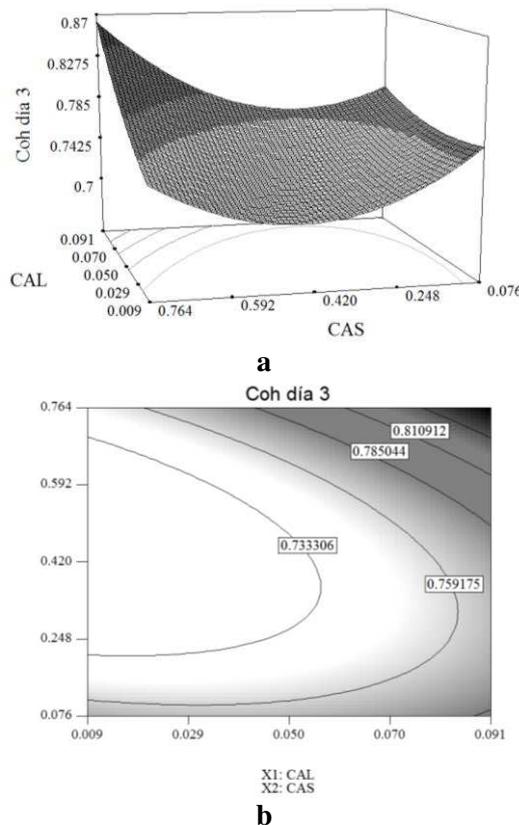


Figura IV.53. Gráficas de superficie de respuesta (a) y líneas de contorno (b) para $Coh_{día3}$ en función de la concentración de CAL y CAS, para el caso de estudio 2.

IV.3.8.5. Gomosidad y Masticabilidad.

La tabla IV.35. muestra los valores de *Gomosidad* y *Masticabilidad* (día 3 y 31) y las respectivas variaciones porcentuales para las diferentes experiencias. Como puede verse, el valor de ambos parámetros resultó ser el mismo debido a que la elasticidad es igual a 1. Se constató que la muestra 5 (máximo CAL y CAS) registró el valor máximo de dicho parámetro (0,1588 N al día 3 y 0,2680 N al día 31). Por el contrario, las muestras 9 (mínimo CAL e intermedia CAS) y 6 (mínimo CAL y máxima CAS) presentaron los menores valores de estos parámetros, 0,1246 N (día 3) y 0,1379 N (día 31), respectivamente. Durante el almacenamiento, los valores se incrementaron entre 2,56 y 68,81%.

Los modelos hallados (tabla IV.36.) resultaron significativos y adecuados, observándose que a medida que aumentan las concentraciones de las variables aumentan los valores de las respuestas. Al día 31, se ve mayor influencia de CAL (siendo el término lineal X_1 más significativo y con mayor coeficiente comparándolo con X_2). A modo de ejemplo la figura IV.54. representa las gráficas de superficie de respuesta y líneas de contorno obtenidas para $Go_{día3}$ en función de CAL y CAS.

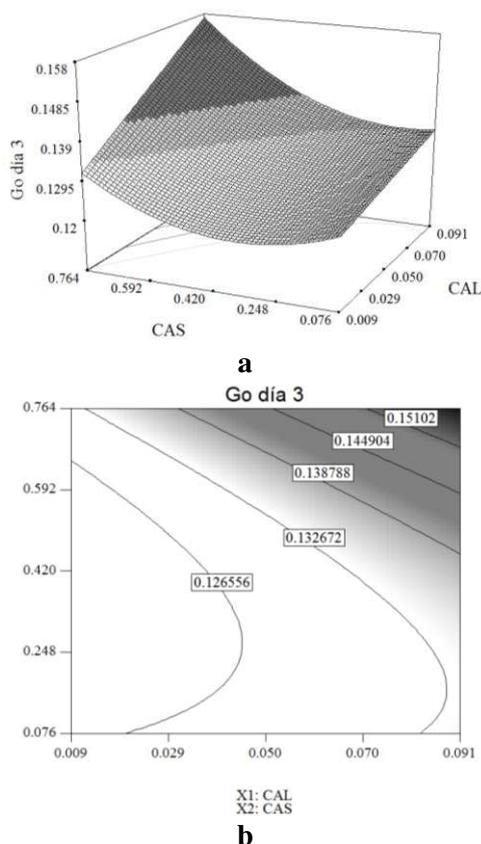


Figura IV.54. Gráficas de superficie de respuesta (a) y líneas de contorno (b) para $Co_{h_{día3}}$ en función de la concentración de CAL y CAS, para el caso de estudio 2.

IV.3.9. ANÁLISIS SENSORIAL.

IV.3.9.1. Descriptores de textura.

En la tabla IV.37. se presentan los valores promedios de los descriptores de textura: *Consistencia (Co)*, *Creosidad (Cre)*, *Aspereza (Asp)* y *Astringencia (Ast)* para cada muestra, a cada tiempo de ensayo (3 y 31 días).

Para el caso de *Co*, si bien presentó puntajes disímiles entre las muestras, los mismos generalmente variaron entre 2 y 5 en la escala, a diferencia de lo ocurrido para el caso de estudio 1 donde la variación fue en toda la escala estudiada (1 a 9). $Co_{día3}$ varió entre 2,30 (experiencia 4: mínimo de CAL y CAS) y 4,51 (máximo de ambas variables), mientras que los valores de $Co_{día31}$ resultaron mayores comparados a los de día 3 variando entre 2,68 y 5,02, para las muestras anteriormente mencionadas. Las variaciones porcentuales fueron entre 5 y 42 % aproximadamente durante la vida de anaquel.

Relacionando $Co_{día3}$ y $Co_{día31}$ con las variables del diseño codificados se observó que a mayores contenidos de CAL (principalmente) y CAS, mayores valores de *Co* (tabla IV.38. y figura IV.55.).

En lo que respecto a *Cre*, se obtuvieron valores promedios muy altos, cercanos al extremo superior de la escala empleada (puntajes mayores a 7), por lo que todas las muestras resultaron muy cremosas (tabla IV.37.). Los valores mínimos los presentó la muestra 4 (mínimo CAL y CAS) tanto al día 3 como al 31, ocurriendo lo contrario para la muestra 5 (máximo CAL y CAS). Durante el almacenamiento se registró un aumento de la cremosidad en general menor al 10%.

Los coeficientes de los términos significativos y los estadísticos de los modelos hallados para $Cre_{día3}$ y $Cre_{día31}$ se presentan en la tabla IV.38. Como puede observarse, sólo los términos lineales de ambas variables (X_1 y X_2) resultaron significativos para ambos días, sin embargo, a día 3, X_1 (CAL) tuvo mayor significancia que X_2 (CAS), sucediendo lo contrario al día 31. A modo de ejemplo, las gráficas de superficie de respuesta y líneas de contorno para $Cre_{día3}$ se muestran en la figura IV.56., identificando que el aumento del contenido tanto de CAL como de CAS produce un aumento en la respuesta evaluada.

Tabla IV.37. Puntajes promedios para los descriptores de textura: *Consistencia (Co)*, *Creemosidad (Cre)*, *Aspereza (Asp)* y *Astringencia (Ast)* y variación porcentual (V%), de las muestras de leches fermentadas probióticas con colesterol reducido evaluadas sensorialmente a los 3 y 31 días de vida útil para el caso de estudio 2.

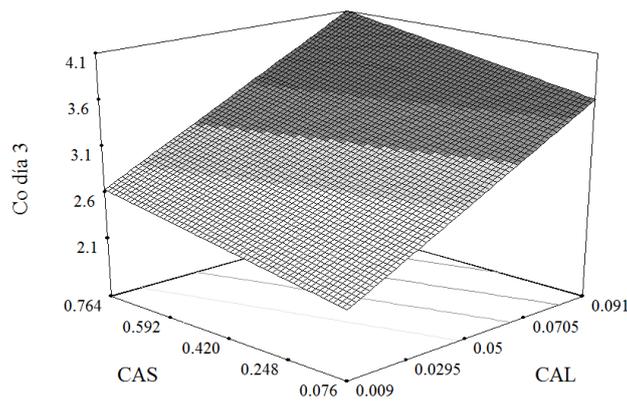
Exp. N°	CONSISTENCIA			CREMOSIDAD			ASPEREZA			ASTRINGENCIA		
	Días		%V	Días		%V	Días		%V	Días		%V
	3	31		3	31		3	31		3	31	
1	3,27	4,02	22,94	8,23	8,56	4,01	0,68	1,01	48,53	1,14	2,70	136,84
2	2,86	3,01	5,24	8,45	8,37	0,95	0,82	1,28	56,10	1,09	1,69	55,05
3	3,62	4,51	24,59	8,47	8,41	0,71	0,70	0,71	1,43	0,75	1,35	80,00
4	2,30	2,68	16,52	7,47	8,20	9,77	0,58	0,73	25,86	0,80	1,25	56,25
5	4,51	5,02	11,31	8,58	9,00	4,90	0,58	0,87	50,00	0,72	0,77	6,94
6	2,71	3,80	40,22	7,62	8,65	13,52	0,62	0,54	12,90	0,89	1,40	57,30
7	3,00	4,26	42,00	7,82	8,80	12,53	0,81	1,22	50,62	1,03	1,52	47,57
8	3,80	4,75	25,00	8,05	8,70	8,07	1,02	1,46	43,14	1,19	1,84	54,62
9	2,56	3,30	28,91	8,32	8,46	1,68	0,75	1,48	97,33	0,99	1,84	85,86
10	2,70	3,50	29,63	8,43	8,70	3,20	0,74	1,25	68,92	0,87	1,20	37,93

Los errores estándares fueron menores al 5%.

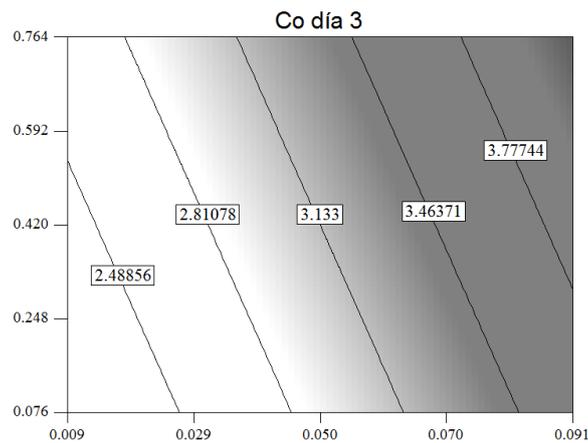
Tabla IV.38. Coeficientes de regresión del modelo polinomial de segundo orden para los descriptores de textura: *Consistencia (Co)* y *Cremosidad (Cre)* (utilizando las variables del diseño codificadas) a los 3 y 31 días de almacenamiento, para el caso de estudio 2.

Factores	Día 3		Día 31	
	Co	Cre	Co	Cre
C	3,13	8,03	3,70	8,59
X ₁	0,73 ^{***}	0,34 ^{***}	0,75 ^{***}	0,13 ^{***}
X ₂	0,24 [*]	0,23 ^{**}	0,48 ^{**}	0,25 ^{***}
X ₁ .X ₂				
(X ₁) ²			0,31 [*]	
(X ₂) ²				
Estadísticos				
R ²	0,8617	0,8739	0,9416	0,9518
R ² -ajust.	0,8222	0,8379	0,9124	0,9380
valor-F	21,81	24,26	32,26	69,13
Falta de ajuste (p-valor)	0,8298	0,7035	0,8940	0,9151

Significancia: * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,05; *** p ≤ 0,001



a



X1: CAL
X2: CAS

b

Figura IV.55. Gráficas de superficie de respuesta (a) y líneas de contorno (b) para $Co_{día3}$ en función de la concentración de CAL y CAS, para el caso de estudio 2.

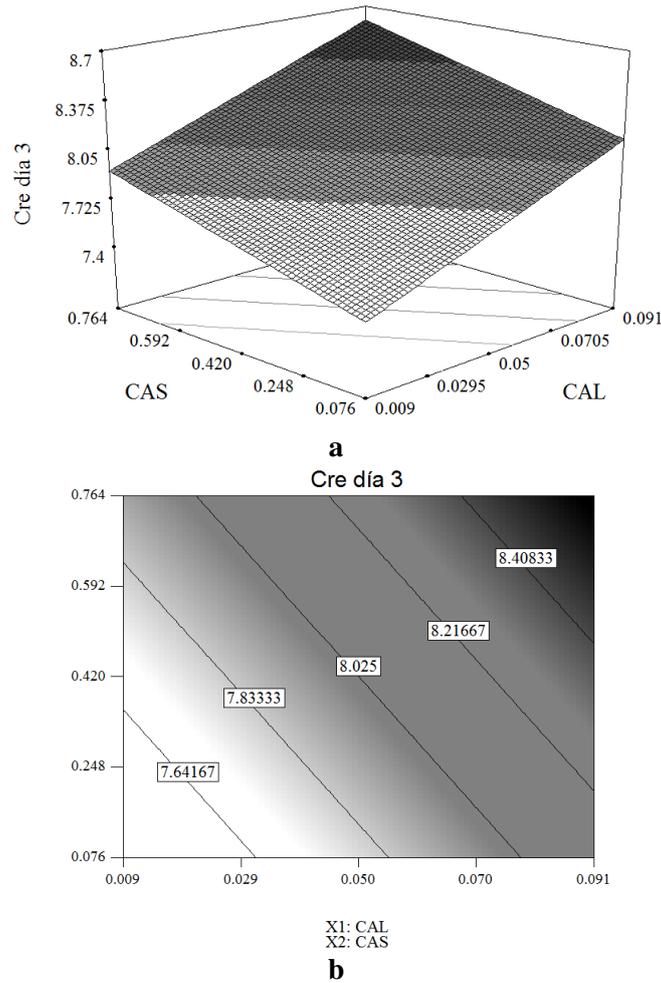


Figura IV.56. Gráficas de superficie de respuesta (a) y líneas de contorno (b) para $Cre_{día\ 3}$, en función de la concentración de CAL y CAS, para el caso de estudio 2.

Por otro parte, las muestras resultaron poco ásperas y poco astringentes, siendo generalmente los puntajes promedios menores 2 durante toda la vida útil (tabla IV.37.). No se encontraron modelos que permitan predecir el comportamiento de ambas respuestas en los días evaluados, debido posiblemente a la escasa diferencia entre los promedios de cada muestra.

A modo de resumen y para una mejor interpretación, se presentan a continuación cuatro gráficos de araña (figura IV.57.) que evidencian la variación de los cuatros atributos de textura entre las distintas muestras y entre el inicio (día 3) y fin (día 31) de la vida útil.

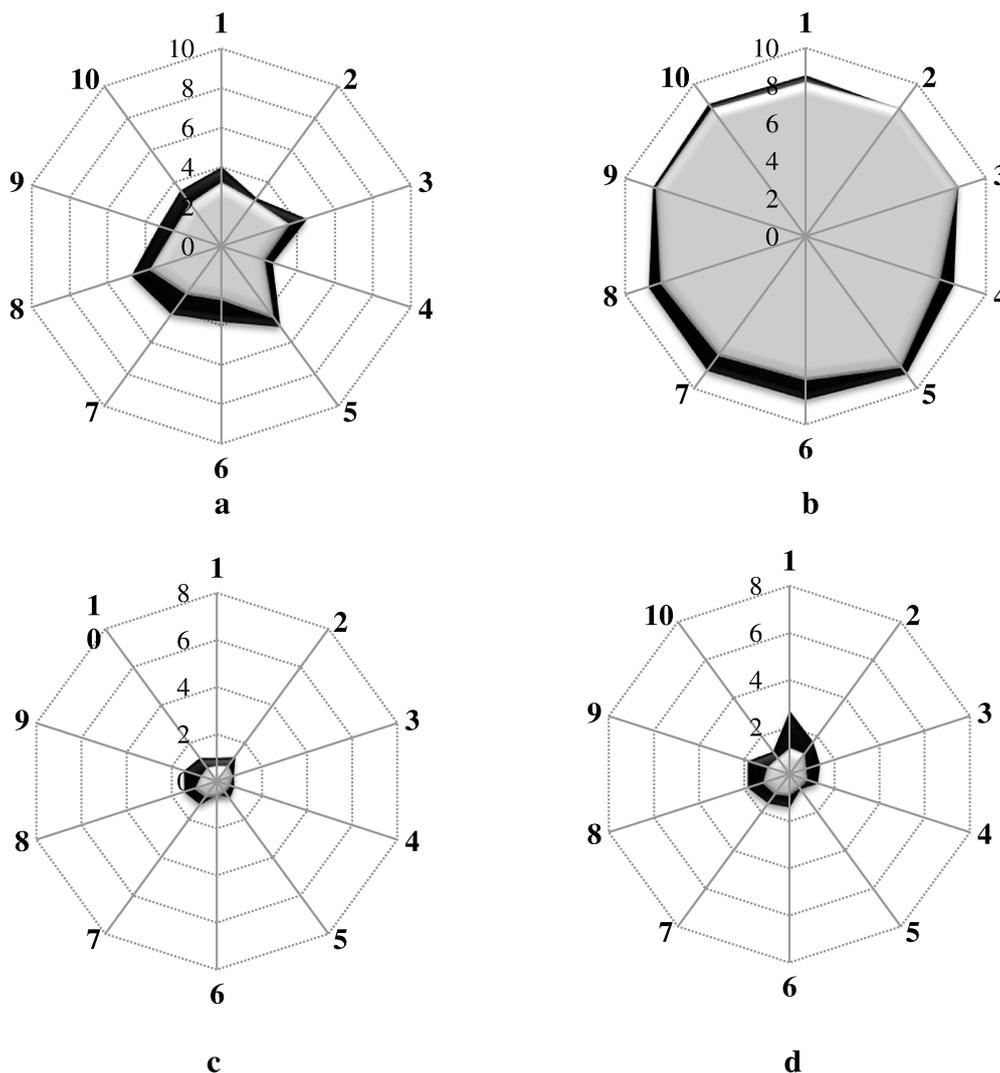


Figura IV.57. Diagramas de araña para cada descriptor de textura: a) *Consistencia*, b) *Creemosidad*, c) *Aspereza*, d) *Astringencia* que comparan los puntajes asignados a cada muestra durante el almacenamiento, para el caso de estudio 2. (Gris: día 3 y negro: día 31).

En general, las muestras poseen muy elevados puntajes de *Cre* (lo cual significa una ventaja), intermedios de *Co*, muy bajos de *Asp* y *Ast* (ventajas). El citrato de calcio agregado no estaría afectando la *Asp* del producto, siendo que se comprobó en otros trabajos que, generalmente, altos niveles de CAL adicionado, particularmente las formas insolubles como los carbonatos y fosfatos, tienden a producir sensaciones arenosas en el paladar, debido a que el tamaño de la partícula y la solubilidad están relacionados con las propiedades de palatabilidad. Por tal motivo, se han desarrollado grados micronizados de citrato tricálcico combinando excelentes características de dispersión con un perfil de sabor neutral en las aplicaciones finales (Gerstner, 2002), como es el caso del aditivo incorporado al presente producto.

IV.3.9.2. Descriptores de *flavor*.

Las tablas IV.39. y IV.40. muestran los valores promedios de los descriptores de *flavor* (“*crema*”, “*suero*”, “*leche en polvo*”, “*cocido*”, “*ácido*” y “*dulce*”) obtenidos del panel de evaluadores entrenados a los 3 y 31 días de almacenamiento, para cada experiencia.

Los valores medios ponderados (Mp) para el sabor a “*crema*”, generalmente rondaron en valores menores o iguales para el mínimo de la escala, apenas perceptible (Mp = 1), siendo la muestra 2 (intermedio CAL, mínima CAS) donde menor cantidad de panelistas la percibieron (10%), mientras que el 50% aproximadamente de los panelistas percibió el sabor a “*crema*” en la muestra 8 (máximo CAL, intermedio CAS) (tabla IV.39. y figura IV.58.a.). El tiempo de almacenamiento no mostró influencia significativa (los puntajes obtenidos fueron similares en ambos tiempos ensayados); tampoco se observaron tendencias que permitan inferir la influencia de las variables del diseño sobre el mismo.

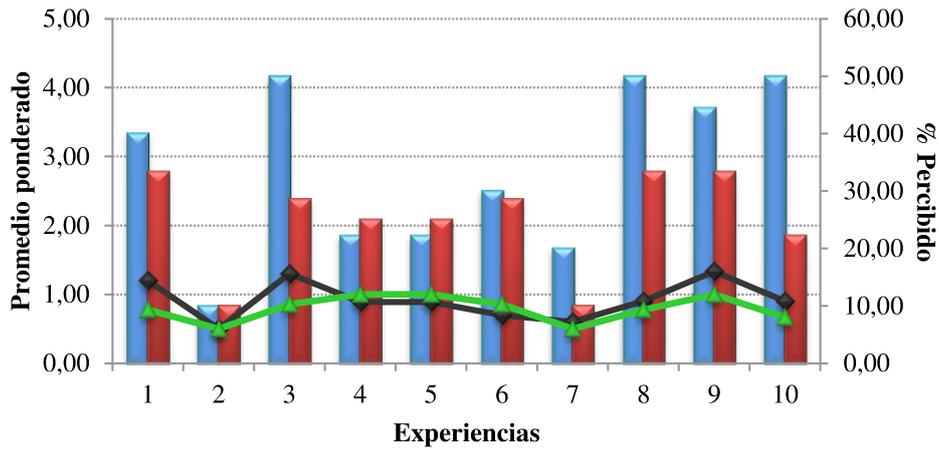
Para el descriptor sabor a “*suero*” generalmente los promedios ponderados fueron menores a 2, pudiéndolo clasificar como apenas perceptible entre las diferentes muestras, tanto al día 3 como al 31 de almacenamiento, siendo detectado por menos del 50% de los evaluadores (tabla IV.39.y figura IV.58.b.).

El sabor a “*leche en polvo*” generalmente se detectó entre apenas (Mp = 1) y poco perceptible (Mp = 3), y menos del 50% de los panelistas lo percibió (tabla IV.39. y figura IV.58.c.).

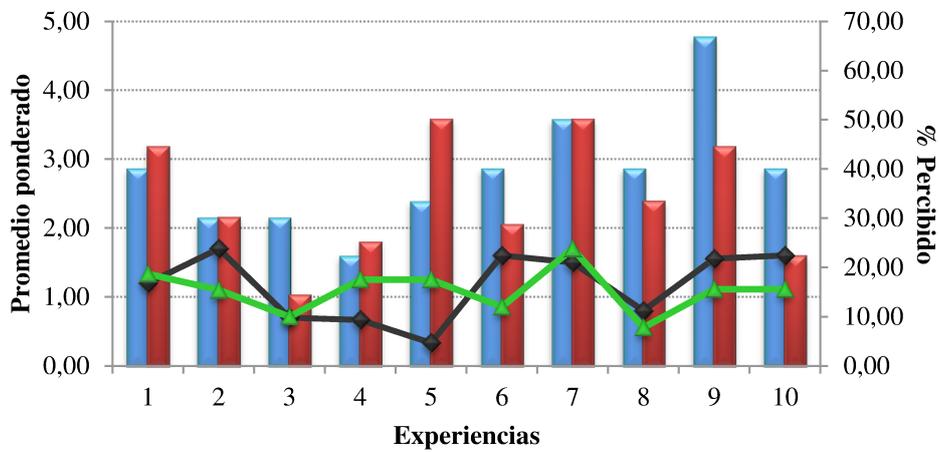
Estos 3 atributos evaluados están asociados a los sabores característicos de insumos utilizados en la elaboración de productos lácteos, como puede ser crema, leche en polvo, concentrado de proteínas de suero. En este trabajo, la adición de LPE, LPD y WPC no generó cambios significativos en el *flavor* de las leches fermentadas obtenidas, ya que la intensidad en la que se encontraron los sabores “*leche en polvo*” y “*suero*” fue entre apenas y poco perceptible y además pocos evaluadores la percibieron.

Tabla IV.39. Puntajes medios ponderados (Mp) y porcentajes percibidos (%Perc.) para los atributos de *flavor*: “*crema*”, “*suero*”, “*leche en polvo*” para las diferentes muestras ensayadas a los 3 y 31 días de almacenamiento, para el caso de estudio 2.

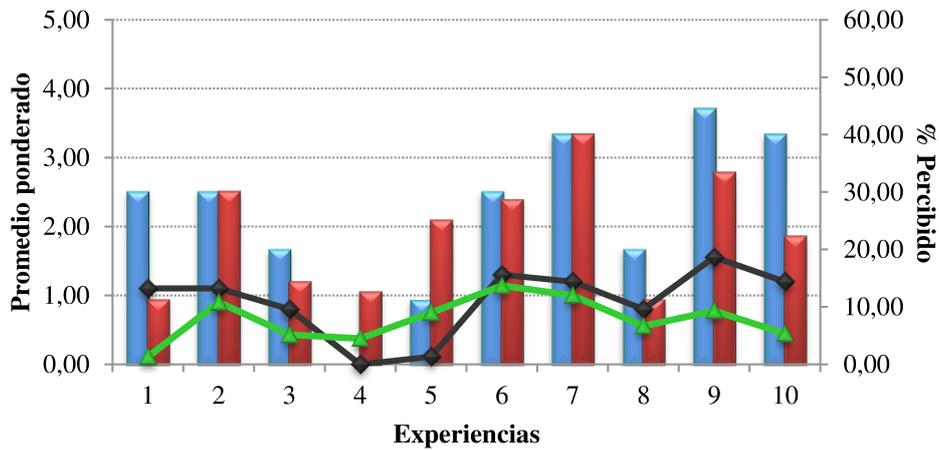
Exp. N°	“ <i>Crema</i> ”				“ <i>Suero</i> ”				“ <i>Leche en polvo</i> ”			
	Día 3		Día 31		Día 3		Día 31		Día 3		Día 31	
	Mp	%Perc.	Mp	%Perc.	Mp	%Perc.	Mp	%Perc.	Mp	%Perc.	Mp	%Perc.
1	1,20	40	0,78	33,33	1,20	40	1,33	44,44	1,10	30	0,11	11,11
2	0,50	10	0,50	10	1,70	30	1,10	30	1,10	30	0,90	30
3	1,30	50	0,86	28,57	0,70	30	0,71	14,29	0,80	20	0,43	14,29
4	0,89	22,22	1	25	0,67	22,22	1,25	25	0	0	0,38	12,50
5	0,89	22,22	1	25	0,33	33,33	1,25	50	0,11	11,11	0,75	25
6	0,70	30	0,86	28,57	1,60	40	0,86	28,57	1,30	30	1,14	28,57
7	0,60	20	0,50	10	1,50	50	1,70	50	1,20	40	1	40
8	0,90	50	0,78	33,33	0,80	40	0,56	33,33	0,80	20	0,56	11,11
9	1,33	44,44	1	33,33	1,56	66,67	1,11	44,44	1,56	44,44	0,78	33,33
10	0,90	50	0,67	22,22	1,60	40	1,11	22,22	1,20	40	0,44	22,22



a



b



c

Figura IV.58. Gráficos de líneas para los promedios ponderados (negro: día 3, verde: día 31) y gráficos de barras para el porcentaje percibido (azul día 3, rojo día 31) de los descriptores de *flavor*: “crema” (a), “suero” (b) y “leche en polvo” (c) de cada experiencia en función del almacenamiento para el caso de estudio 2.

En general, en las muestras de leches fermentadas no se detectó sabor a “*cocido*”, a excepción de las muestras 4, 9 y 10, siendo el puntaje calificado como “apenas perceptibles” y sólo 1 o 2 panelistas percibieron este sabor (tabla IV.40. y figura IV.59.). Este atributo se encuentra íntimamente asociado a las etapas de elaboración del producto, ya que durante la elaboración de las leches fermentadas se llevan a cabo procesos de calentamiento a elevadas temperaturas que pueden generar la aparición de este tipo de *flavor*.

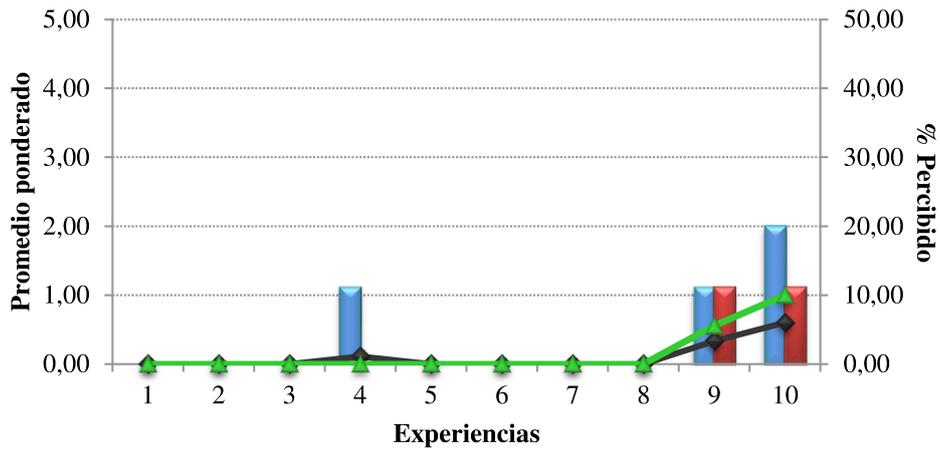
El gusto “*ácido*” presentó variaciones entre el día 3 y 31 y entre las diferentes muestras, siendo mayor la intensidad a fin de vida útil. Más del 60% de los panelistas lo percibieron en todas las muestras. La experiencia 5 (máximos niveles de ambas variables) resultó ser la de menor acidez (puntaje entre apenas y poco perceptible), mientras que la muestra 10 (intermedio nivel de CAL y CAS) fue la de mayor acidez, calificando entre moderadamente y muy perceptible) (tabla IV.40. y figura IV.59.b.). El aumento de acidez durante el almacenamiento se correlaciona con el aumento de la acidez titulable y la disminución de pH registrados durante el período de aptitud de los productos (fenómeno de post-acidificación). Como se explicó anteriormente en el caso de estudio 1, en este tipo de productos es deseable una acidez entre poco y moderadamente perceptible, siendo la mayoría de las muestras calificadas en este rango.

En el caso del atributo “*dulce*”, fue detectado entre poco y moderadamente en la mayoría de las experiencias, por aproximadamente el 80% de los panelistas. La intensidad del mismo disminuyó durante el almacenamiento (tabla IV.40. y figura IV.59.c.).

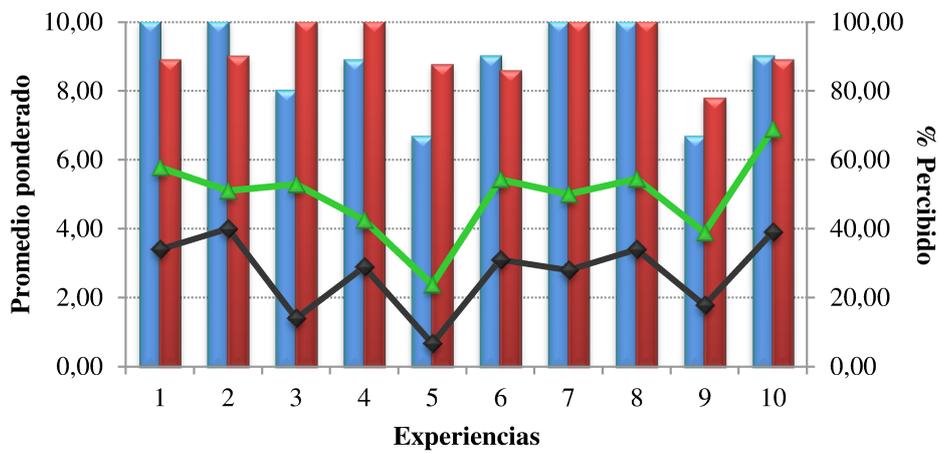
En general, para todas las muestras, con excepción del gusto “*ácido*” y “*dulce*”, los demás atributos de *flavor* evaluados fueron calificados entre apenas y poco perceptibles, y las variables en estudio no se correlacionaron con la presencia/ausencia de los mismos, debiéndose principalmente a condiciones del proceso o de las materias primas empleadas en la elaboración de las leches fermentadas para este caso de estudio.

Tabla IV.40. Puntajes medios ponderados (Mp) y porcentajes percibidos (% Perc.) para los atributos de *flavor*: “cocido”, “ácido”, “dulce” para las diferentes muestras ensayadas a los 3 y 31 días de almacenamiento, para el caso de estudio 2.

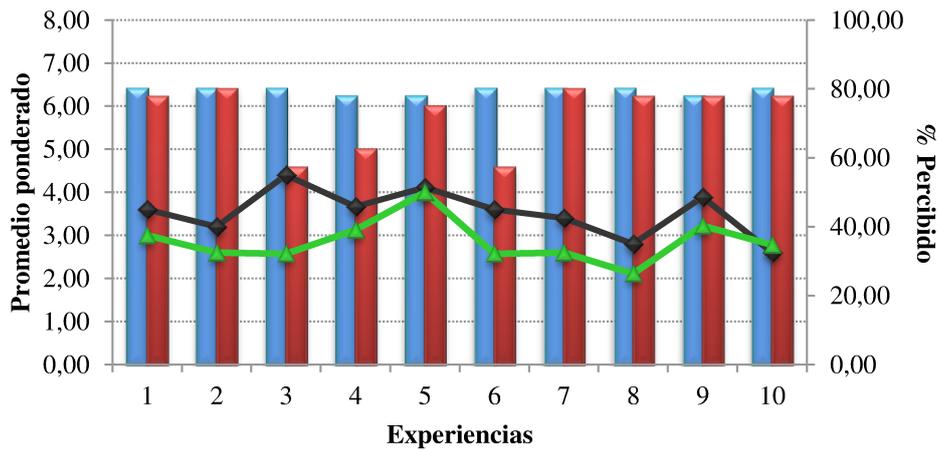
Exp. N°	“Cocido”				“Ácido”				“Dulce”			
	Día 3		Día 31		Día 3		Día 31		Día 3		Día 31	
	Mp	%Perc.	Mp	%Perc.	Mp	%Perc.	Mp	%Perc.	Mp	%Perc.	Mp	%Perc.
1	0	0	0	0	3,40	100	5,78	88,89	3,60	80	3	77,78
2	0	0	0	0	4	100	5,10	90	3,20	80	2,60	80
3	0	0	0	0	1,40	80,00	5,29	100	4,40	80	2,57	57,14
4	0,11	11,11	0	0	2,89	88,89	4,25	100	3,67	77,78	3,13	62,50
5	0	0	0	0	0,67	66,67	2,38	87,50	4,11	77,78	4	75
6	0	0	0	0	3,10	90	5,43	85,71	3,60	80	2,57	57,14
7	0	0	0	0	2,80	100	5,00	100	3,40	80	2,60	80,00
8	0	0	0	0	3,40	100	5,44	100	2,80	80	2,11	77,78
9	0,33	11,11	0,56	11,11	1,78	66,67	3,89	77,78	3,89	77,78	3,22	77,78
10	0,60	20	1	11,11	3,90	90	6,89	88,89	2,60	80	2,78	77,78



a



b



c

Figura IV.59. Gráficos de líneas para los promedios ponderados (negro día 3, verde día 31) y gráficos de barras para el porcentaje percibido (azul día 3, rojo día 31) de los descriptores de *flavor*: “cocido” (a), “ácido” (b) y “dulce” (c) de cada experiencia en función del almacenamiento, para el caso de estudio 2.

IV.3.9.3. Defectos.

La tabla IV.41. expresa los promedios de los descriptores de defectos hallados por el panel sensorial en cada una de las experiencias de leches fermentadas para el día 3 y 31 de almacenamiento.

En la mayoría de los productos se percibió un sabor no deseado, catalogado como “*extraño*” por los evaluadores, generalmente en el orden de apenas perceptible (promedio cercano a 1). La percepción del mismo en general se incrementó levemente a lo largo del tiempo de almacenamiento.

El gusto a “*viejo*” fue detectado sólo en tres muestras al fin de la vida útil (experiencias 1, 7 y 8), siendo evaluado como apenas perceptible.

Otro defecto, como “*metálico*”, fue detectado de manera discontinua, siempre con valores medios menores a 1.

Para ninguno de los defectos estudiados se encontró relación que los asocie con las distintas formulaciones empleadas en el diseño. Probablemente, la aparición de estos defectos estuvo asociada a variaciones ocurridas en los procesos de elaboración y propias del almacenamiento.

Todos los defectos encontrados tienen puntajes muy bajos, generalmente menores a 2, calificando en el rango de apenas perceptibles.

Tabla IV.41. Puntaje promedio de los defectos hallados por el panel sensorial en función de las experiencias y el tiempo de almacenamiento, para el caso de estudio 2.

Exp. N°	<i>Extraño</i>		<i>Viejo</i>		<i>Metálico</i>	
	Días		Días		Días	
	3	31	3	31	3	31
1	0,6	1,2	0	1	0,3	0
2	0,7	1	0	0	0,6	0,8
3	0,2	0,7	0	0	0,2	0,8
4	0,2	0,4	0	0	0	0,4
5	1,3	2,4	0	0	0	0
6	1	2,1	0	0	0,5	0,9
7	0,7	1,1	0	0,9	0	0
8	0,9	1,5	0	1	0	1
9	0,7	1,1	0	0	0,2	1
10	0,4	1,2	0	0	0,3	0,9

Hacia el fin de vida útil (31 días), la mayor cantidad de defectos, se encontró en la muestra 8 y la que presentó menos defectos fue la muestra 5. La muestra 4 fue en la que menor intensidad se encontraron los defectos *extraño* y *metálico* (figura IV.60.). Como

puede observarse, los defectos encontrados tienden a aumentar durante la vida útil del producto. Es común en este tipo de sistemas encontrar sabores a *rancio* u *oxidado*, pero en este caso no fueron percibidos.

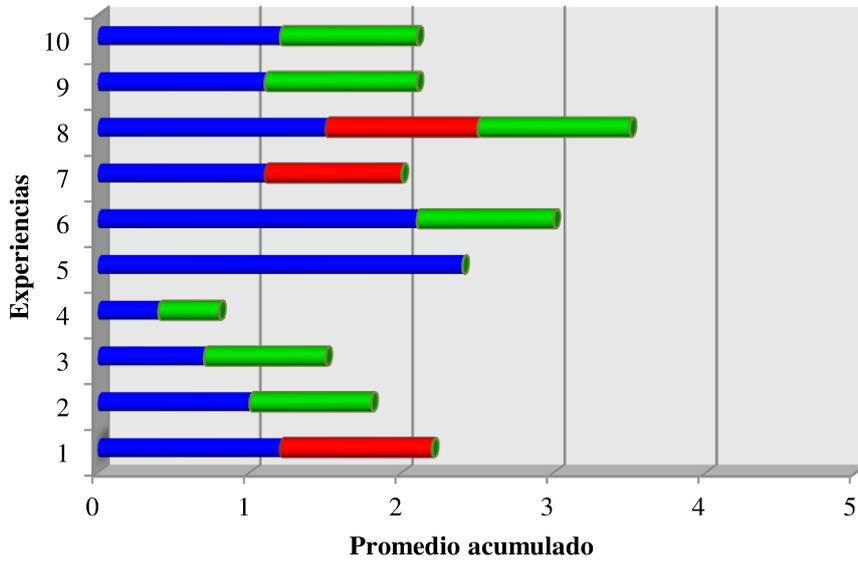


Figura IV.60. Promedio acumulado de los defectos encontrados al día 31, para las diferentes muestras que conforman el caso de estudio 2. En azul: extraño; rojo: viejo; verde: metálico.

IV.4. UTILIZACIÓN DE COMPUESTOS PREBIÓTICOS COMERCIALES Y ADITIVOS ESPESANTES, SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS Y CONDICIONES GASTROINTESTINALES SIMULADAS POR MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS. SUPERVIVENCIA EN LA MATRIZ DEL PRODUCTO.

IV.4.1. AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS PROBIÓTICAS UTILIZADAS.

Se aislaron de productos comerciales presentes en el mercado europeo cepas de lactobacilos y bifidobacterias con capacidad probiótica comprobada con medios selectivos adecuados propuestos en la bibliografía. Por otro lado, se revitalizaron cepas provenientes de la Colección Scardovi (BUSCOB) de la Universidad de Bologna (UNIBO) con potencial capacidad probiótica y, por último, también se trabajó con las cepas utilizadas en la elaboración de las leches fermentadas de la presente tesis (casos de estudio 1 y 2). Posteriormente, se identificaron fenotípica y genotípicamente todas las cepas en estudio.

La lista de todas las cepas utilizadas, los recuentos obtenidos (UFC.mL⁻¹) tipo de medio utilizado para el aislamiento en los casos de las leches fermentadas comerciales y los pares de primers usados en las reacciones de PCR para la identificación molecular se muestran en la tabla IV.42.

Todos los productos comerciales analizados contenían microorganismos viables en cantidades en el rango 10⁵ – 10⁸ UFC.mL⁻¹, observándose una gran variabilidad en el recuento realizado en los productos. *L. acidophilus* (M399), aislado de Provital, mostró el menor crecimiento en el medio, tal vez debido a la presencia de *L. casei* en el mismo producto y una posible inhibición por este último. Las colonias de *L. acidophilus* en MRS-bilis pudieron diferenciarse de las de *L. casei* ya que *L. casei* forma colonias cremosas blancas redondeadas, mientras que las colonias de *L. acidophilus* aparecen como colonias transparentes irregulares (Vinderola y Reinheimer, 2000).

Todas las especies conservaron su morfología vistas al microscopio óptico con la excepción de *B. animalis* spp. *lactis* (aislada de Activia) que no presentó la morfología microscópica típica para el género (formas ramificadas y bifurcadas en Y o V o espatulada) pero algunos autores consideran que la forma específica también depende del medio en el cual se cultiva (Scardovi, 1987).

Tabla IV.42. Lista de cepas aisladas, seleccionadas e identificadas a partir de productos comerciales, colección Scardovi (BUSCOB – UNIBO) y aquellos utilizados en los protocolos de elaboración de los casos de estudio 1 y 2.

Microorganismo	Referencia	Fuente ^a	Número de aislados	Medio de cultivo para el aislamiento ^b	UFC/mL	Primers ^c
<i>L. acidophilus</i>	M399	Provital (L.F.C.)	1	MRS-B, ANA	<10 ⁵	AciI-AciII
<i>L. rhamnosus</i>	M403 M404 M405	Yomo rinfuerzo (L.F.C.)	3	MRS-B, AERO MRS-VANC, ANA MRS-B, ANA	4.10 ⁸ 3,4.10 ⁸ 3,4.10 ⁷	Y2-rham
<i>L. paracasei</i>	M417 M418 M419	KYR (L.F.C.)	3	MRS-B, ANA MRS-pH 5.4, ANA MRS-B, AERO	5.10 ⁵ 4,4.10 ⁶ 5,7.10 ⁶	Y2-para
<i>B. animalis ssp. lactis</i>	M425	Activia (L.F.C.)	1	TPY+MUP	3,25.10 ⁸	ERIC I-ERIC II
<i>B. animalis ssp. lactis</i>	M426	Mila (L.F.C.)	1	TPY+MUP	4,56.10 ⁷	ERIC I-ERIC II
<i>L. acidophilus</i>	M384 (Barilla)	Scardovi	1			AciI - AciII
<i>L. acidophilus</i>	M141	Scardovi	1			AciI - AciII
<i>L. rhamnosus</i>	M407 (LGG)	Scardovi	1			Y2-rham
<i>L. paracasei</i>	M161 (L8)	Scardovi	1			Y2-para
<i>B. animalis ssp. lactis</i>	MB29	Scardovi	1			ERIC I-ERIC II
<i>B. longum ssp. longum</i>	ATCC 15707 ^T (RE11)	Scardovi	1			ERIC I-ERIC II
<i>B. longum ssp. longum</i>	B1835	Scardovi	1			ERIC I-ERIC II
<i>L. acidophilus</i>	M403 (LA5)	Hansen	1			ND
<i>L. acidophilus</i>	M402 (LA3)	Hansen	1			ND
<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>L. delbrüeckii ssp. lactis</i> y <i>L. delbrüeckii ssp. bulgaricus</i>	YC – 180	Sacco	1			ND
<i>L. rhamnosus</i>	M406 (SP1)	Sacco	1			ND

^a L.F.C.: leche fermentada comercial; ^bMRS-B: MRS-bilis; MRS-VANC: MRS-vancomicina; TPY+MUP: TPY+Mupirocina; ^c ND: no determinado.

Se seleccionaron aquellas colonias con características morfológicas macro y microscópicas típicas de cada especie y descritas en la bibliografía (Biavati y Mattarelli, 2006; Bergey y col., 2011). Se realizaron cultivos puros a partir de éstas colonias caracterizadas para los estudios posteriores.

La detección y correcta identificación de los microorganismos empleados como probióticos comercialmente es de gran importancia para garantizar la autenticidad de su etiquetado y, en su caso, para apoyar las posibles alegaciones de salud de estos alimentos. La identificación tradicional de microorganismos basada en características fenotípicas es bastante lenta y no siempre adecuada para la correcta identificación o diferenciación entre especies muy próximas taxonómicamente. El reemplazo lógico sucedido en este aspecto ha sido el empleo de técnicas moleculares para complementar o sustentar la identificación de especies bacterianas. La mayoría de estas técnicas se han basado en el análisis de secuencias específicas presentes en genes integrantes del operón del ARN ribosómico y en las regiones intergénicas espaciadoras, como ocurre en el caso de las especies de lactobacilos para el gen 16S rDNA. Este hecho se basa en el carácter universal del funcionamiento de estos genes que conduce a la presencia de regiones conservadas, amplificadas por primers (cebadores) universales, y de regiones variables que permiten establecer agrupaciones filogenéticas según el grado de homología de las secuencias nucleotídicas y, por tanto, la identificación de especies bacterianas. Sin embargo, la comparación de secuencias del gen 16S rDNA de bifidobacterias refleja una elevada analogía entre las especies (similitud que oscila entre 92 y 99%) que dificulta su diferenciación basada en el análisis de dicha secuencia, por lo que se han buscado otros genes polimórficos para la identificación de estas especies, y se han empleado otras técnicas como ERIC-PCR (secuencias consenso repetitivas intragénicas de enterobacterias) en estos casos (Tannock, 1999).

En este trabajo se pudieron identificar molecularmente las especies estudiadas ya sea por PCR-especie específica (en el caso de los lactobacilos) o ERIC-PCR (para las bifidobacterias), con excepción de *L. rhamnosus* M407, por lo cual se decidió secuenciar el gen 16S rDNA entero para su confirmación. El resultado del secuenciamiento informó que esta especie no puede ser diferenciada del grupo *L. casei*, resultados que corroboraron otros investigadores como Mori y col. (1997) y Kao y col. (2007).

Todos estos estudios nos permitieron mostrar que el uso combinado de técnicas fenotípicas (como lo son el crecimiento en medios específicos y observación

microscópica) y las metodologías moleculares para la tipificación proveen información útil para la detección, identificación de estos tipos de microorganismos.

IV.4.2. FERMENTACIÓN DE COMPUESTOS PREBIÓTICOS Y ADITIVOS ESPESANTES.

Los componentes de la dieta no digeribles tales como oligosacáridos y polisacáridos complejos pasan a través del tracto digestivo superior hasta el colon donde se ha reportado que estimulan selectivamente la proliferación y/o la actividad de las poblaciones de bacterias probióticas *in situ*. La capacidad de las bacterias para degradar y metabolizar tales hidratos de carbono con niveles variables de polimerización y sustitución, y que contienen una gran variedad de enlaces glicosídicos, contribuye a la competitividad de una cepa dada en el tracto gastrointestinal (Kaplan y Hutkins, 2000). Durante los últimos años, se han realizado muchos esfuerzos para desarrollar "alimentos funcionales" que contienen tanto pro como prebióticos. En este trabajo, los distintos prebióticos comerciales y otros sustratos como los aditivos empleados en la elaboración de leches fermentadas fueron testeados (tabla IV.43.) con las cepas identificadas para ver si éstas eran capaces de metabolizarlos.

Tabla IV.43. Descripción de los sustratos utilizados en las fermentaciones.

Compuestos Prebióticos
Cup Oligo, Bifidus Growth Factor, Giulio Gross, Italia (GOS). Son galactosacáridos de alta pureza, que incluyen 4'-galactosillactosa.
Actilight [®] , Beghin Meiji, Francia (FOS). Son fructooligosacáridos de cadena corta obtenidos de remolacha dulce.
Orasti [®] HIS, Beneo, 86% de inulina y 14% de glucosa, Orafti, Bélgica (BI). Obtenida a partir de achicoria.
Orasti [®] HP (Raftiline o Beneo HP), 100% de inulina, Orafti, Bélgica (RI). Obtenida a partir de achicoria.
Aditivos
Goma Espina Corona, Nature Gum, Argentina (ECG).
Gelatina, PB Leiner, Argentina (G). De origen bovino.
Almidón Modificado de Mandioca, Glutal S. A. Argentina (MCS).

El ensayo se llevó a cabo con las cepas: *B. longum* ssp. *longum* ATCC 15707^T (ref.: RE11), *B. animalis* ssp. *lactis* MB29, *B. longum* ssp. *longum* B1835, *B. animalis* ssp. *lactis* M425 (Activia), *B. animalis* ssp. *lactis* M426 (Mila), *L. paracasei* M161 (L8), *L. paracasei* M417 (Kyr), *L. acidophilus* M399 (Provital), *L. rhamnosus* M405 (Yomo), *L. acidophilus* M384 (Barilla), *L. acidophilus* M403 (La5), *L. acidophilus* M402 (La3), *L. rhamnosus* M406 (Sp1) y el starter utilizado en los caso de estudio 1 y 2 (YC-180).

Las figuras IV.61., IV.62., IV.63, IV.64., muestran los cambios de pH entre 0, 2 y 5 días en los medios TPY ó MRS modificados con los diferentes sustratos para las bifidobacterias y lactobacilos testeados. El pH por debajo de 5,2 indica la utilización del sustrato adicionado como una fuente de carbono para el metabolismo del microorganismo estudiado, esto también se vio reflejado en el cambio en el viraje del indicador (de púrpura a amarillo).

Los resultados mostraron que GOS y FOS fueron los prebióticos comerciales más utilizados para las cepas ensayadas, mientras que G y AMM no fueron fermentados por ninguna de las cepas ensayadas. La diferenciación de utilización de sustrato era evidente a partir de 24 horas y en algunos casos la máxima fue en el día 5. En general, las bifidobacterias crecieron con menor intensidad que las cepas de lactobacilos en diferentes sustratos.

En el caso de goma espina corona (GEC), este compuesto fue utilizado eficientemente por 3 especies de bifidobacterias: *B. animalis* ssp. *lactis* MB29, *B. longum* ssp. *longum* B1835 y ATCC 15707^T (RE11) pero no para las especies de bifidobacterias comercialmente probados: Mila y Activia y especies de lactobacilos. RAF no fue utilizado por ninguna bifidobacteria. *L. rhamnosus* M405 (aislado de Yomo) solo utilizó GOS, mientras que *L. rhamnosus* M406 (Sp1) sólo creció en presencia de GLU. Esto puede indicar que esta cepa es muy selectiva en los sustratos que utilizan para su metabolismo. Tampoco el cultivo iniciador (YC-180) utilizó los aditivos espesantes ensayados.

Si bien no se observa en las gráficas, se realizó un control negativo (sólo con MRS ó TPY modificado), donde ninguna de los microorganismos testeados mostró crecimiento en ausencia de sustratos. El control de GLU en todos los casos dio positivo.

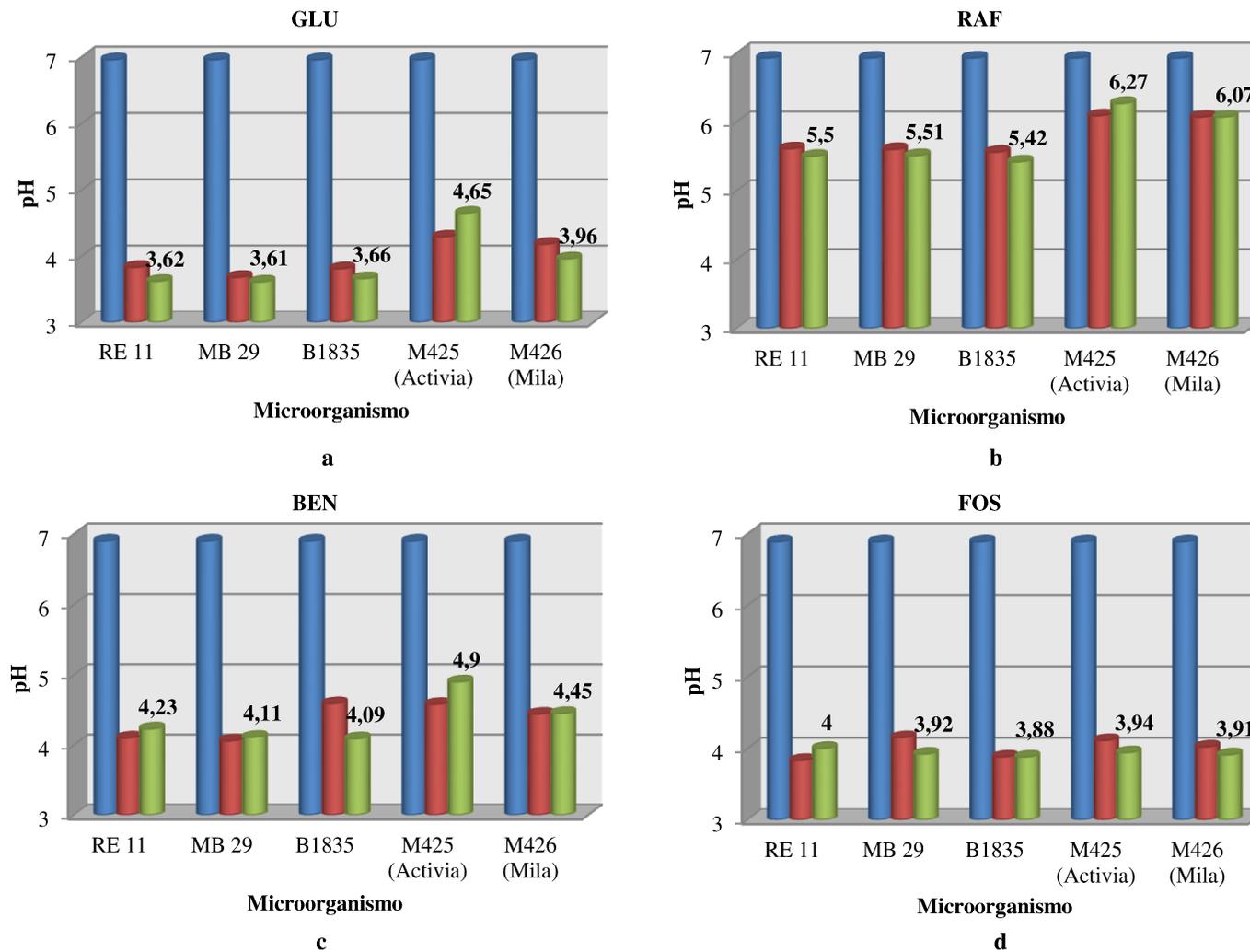


Figura IV.61. Cambios de pH del medio TPY-modificado adicionado con: a) Glucosa (GLU, control positivo), b) Raftiline (RAF), c) Inulina (BEN), d) Fructooligosacárido (FOS) para diferentes bifidobacterias entre los días 0 (azul), 2 (rojo) y 5 (verde). Valores de pH final debajo de 5,2 indican reacción positiva.

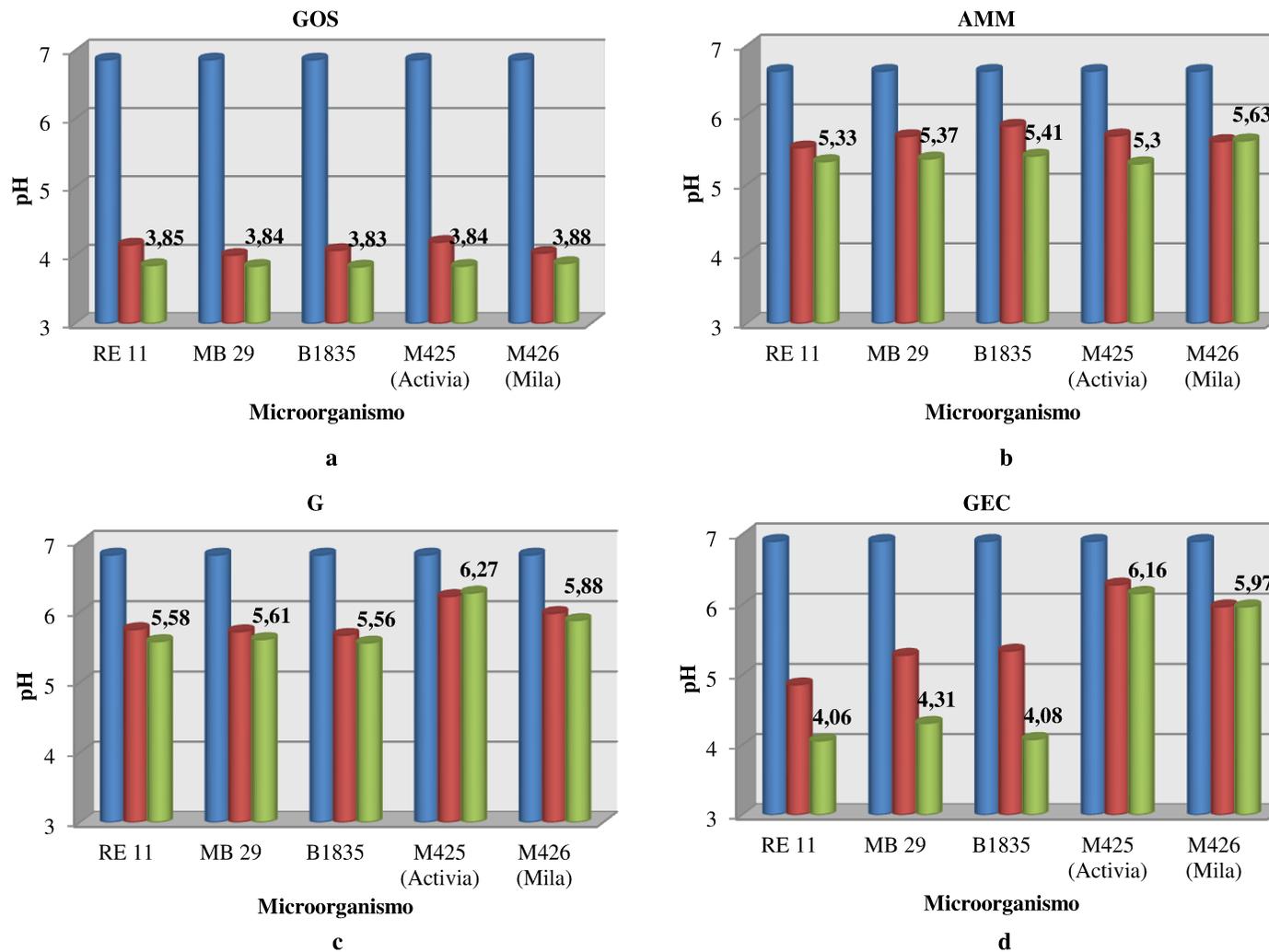


Figura IV.62. Cambios de pH del medio TPY-modificado adicionado con: a) Galactooligosacárido (GOS), b) Almidón modificado de mandioca (AMM), c) Gelatina (G), d) Goma espina corona (GEC) para diferentes bifidobacterias entre los días 0 (azul), 2 (rojo) y 5 (verde). Valores de pH final debajo de 5,2 indican reacción positiva.

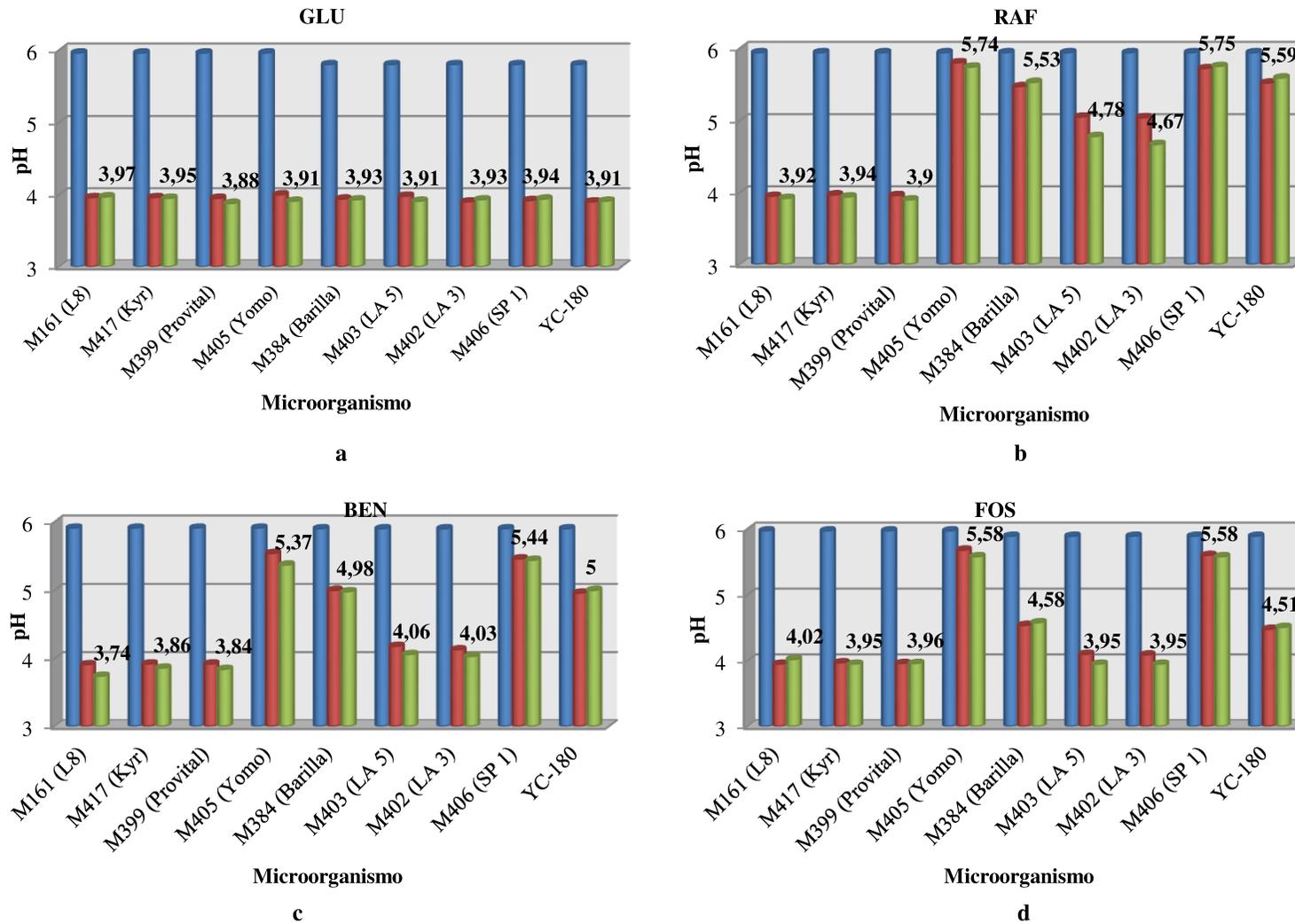


Figura IV.63. Cambios de pH del medio MRS-modificado adicionado con: a) Glucosa (GLU, control positivo), b) Raftiline (RAF), c) Inulina (BEN), d) Fructooligosacárido (FOS) para diferentes lactobacilos y starter entre los días 0 (azul), 2 (rojo) y 5 (verde). Valores de pH final debajo de 5,2 indican reacción positiva.

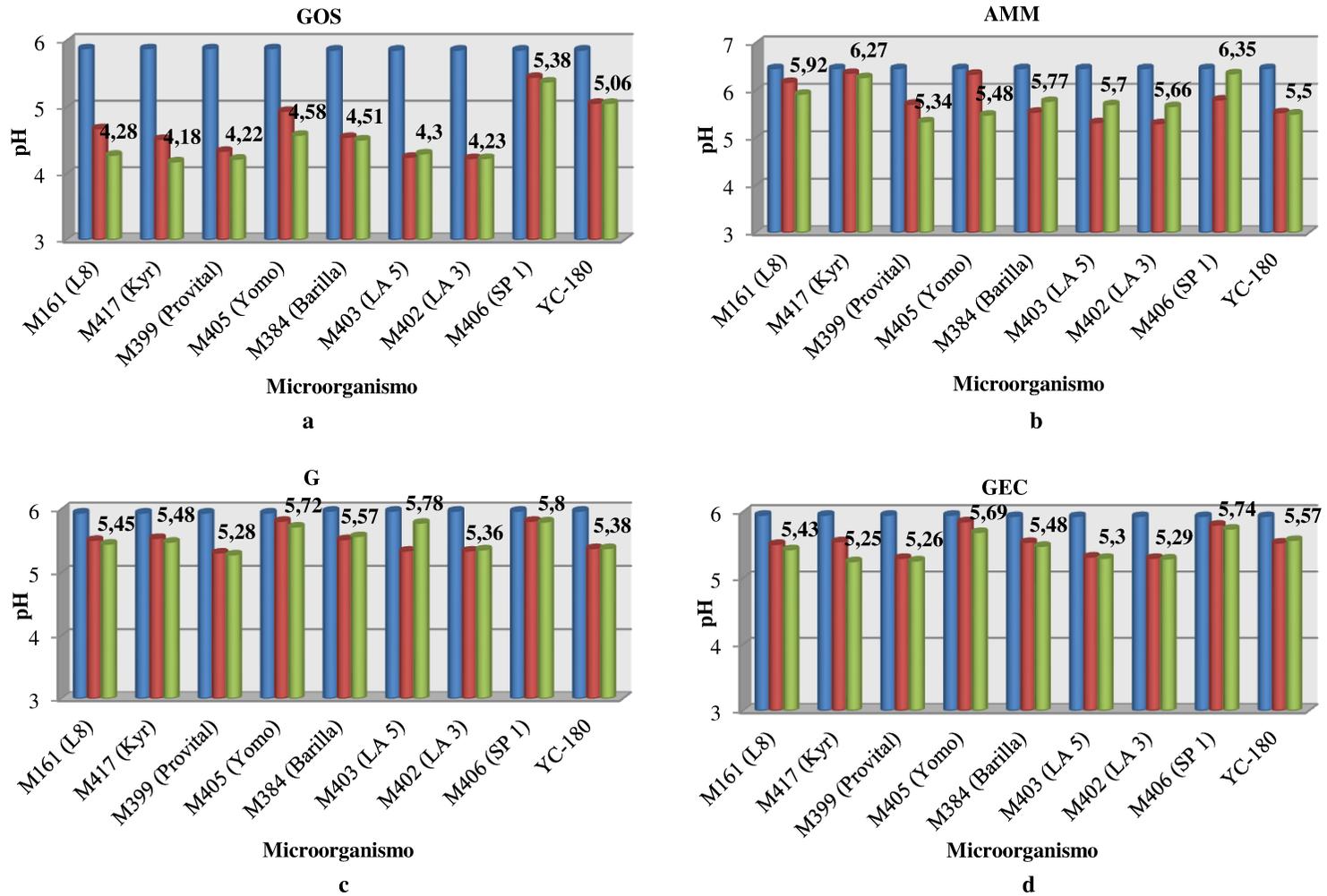


Figura IV.64. Cambios de pH del medio MRS-modificado adicionado con: a) Galactooligosacárido (GOS), b) Almidón modificado de mandioca (AMM), c) Gelatina (G), d) Goma espina corona (GEC) para diferentes lactobacilos y starter entre los días 0 (azul), 2 (rojo) y 5 (verde). Valores de pH final debajo de 5,2 indican reacción positiva.

Varios estudios realizados demuestran que la capacidad de los lactobacilos y bifidobacterias para fermentar carbohidratos prebióticos es específica de cada cepa. Kaplan y col. (2000) mostraron que FOS fue utilizado por 4 cepas de *L. acidophilus*, 4 cepas de *L. plantarum*, 2 cepas de *L. casei*, pero no por *L. rhamnosus* LGG. En este trabajo también se obtuvieron resultados similares entre cepas diferentes de la misma especie, sin embargo, hay cepas de *L. casei* que utilizan FOS y otras que no. Pinheiro De Souza Oliveira y col. (2011) demostraron que Inulina Beneo es utilizada por cepas de *L. acidophilus* y *L. rhamnosus*. En el presente estudio se confirma que Beneo es utilizado por cepas *L. acidophilus*, sin embargo, las cepas de *L. rhamnosus* ensayadas no lo consumieron. En éste estudio, GOS fue utilizado por todas las cepas de las diferentes especies de lactobacilos testeadas, con excepción de *L. rhamnosus* Sp1, lo cual concuerda con los resultados de los ensayos realizados por Cadelle Cobas y col. (2011).

IV.4.3. ESTUDIO DE LA SUPERVIVENCIA EN CONDICIONES GASTROINTESTINALES SIMULADAS Y SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIBIÓTICOS.

Se seleccionaron las cepas (4 bifidobacterias y 4 lactobacilos) con mayor interés tecnológico y otras comerciales (a fines comparativos) y se probó su capacidad de supervivencia en condiciones gastrointestinales simuladas, es decir, condiciones de pH bajo (2,5) + enzima pepsina y en presencia de sales biliares (2%); y por otro lado se evaluó la susceptibilidad a los antibióticos.

De acuerdo a los resultados (tabla IV.44.), generalmente, las cepas mostraron óptima resistencia a los tratamientos de bajo pH+pepsina después de 15 min de exposición (porcentaje de supervivencia mayor al 90%), con excepción de *B. longum* ssp. *longum* B1835 y RE11, las cuales resultaron muy sensibles y no sobrevivieron al tratamiento. Estos resultados concuerdan por lo reportado por Santini y col. (2010) donde *B. longum* fue la especie más susceptible a las condiciones gastrointestinales simuladas. Después de 90 min de tratamiento, el recuento fue más variable entre los diferentes microorganismos testeados. *L. acidophilus* M403 (La5) resultó ser el más resistente a estas condiciones (95% supervivencia) y en menor medida *B. animalis* ssp. *lactis* M426 aislado de Mila (91%) y MB29 (82%). En el caso de *L. acidophilus* M384 (Barilla) y *L. rhamnosus* M405 (aislado de Yomo) y M406 (Sp1) la muerte celular fue más pronunciada a este tiempo ensayado (figura IV.65.).

Tabla IV.44. Recuento de células viables ($\log \text{ UFC.mL}^{-1}$) y porcentaje de supervivencia para lactobacilos y bifidobacterias a diferentes tiempos de exposición (15 y 90 min) a bajos pH (2,5) + enzima pepsina.

Tiempo de exposición (min)	Recuento							
	M384 Barilla	M403 La5	M406 Sp1	M405 Yomo	MB29	M426 Mila	B1835	RE11
0	8,67	8,64	8,41	8,33	8,49	8,00	8,26	8,70
15	8,85	8,41	8,35	8,30	7,65	7,27	< 3	< 3
90	4,12	8,13	3,00	3,80	6,97	7,34	< 3	< 3
% Supervivencia después de 15 min	102,08	97,33	99,31	99,70	90,08	90,93	-	-
% Supervivencia después de 90 min	47,52	94,15	35,67	45,60	82,08	91,74	-	-

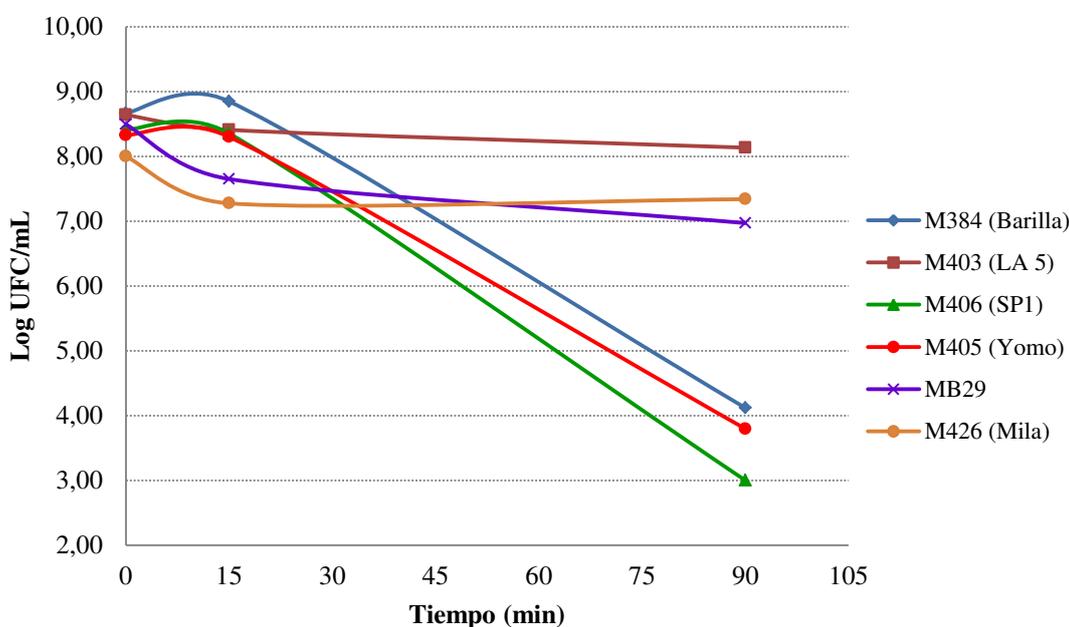


Figura IV.65. Supervivencia de cepas de lactobacilos y bifidobacterias a pH 2,5 + pepsina. B1835 y RE11 no sobrevivieron a los 15 min por eso no se graficaron.

Por otro lado, todas las cepas testeadas sobrevivieron al tratamiento con sales biliares al 2% luego de 1 y 4 horas de exposición (tabla IV.45. y figura IV.66.). No se observaron cambios después de la primera hora de tratamiento (porcentaje de supervivencia mayor al 92%). Luego de 4 horas de incubación, el porcentaje de supervivencia fue entre 85 – 99% de la población inicial, siendo *L. longum* spp. *longum* B1835 la menos resistente.

Tabla IV.45. Recuento de células viables ($\log \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$) y porcentaje de supervivencia para lactobacilos y bifidobacterias a diferentes tiempos de exposición (1 y 4 hs) a Bilis 2%.

Tiempo de exposición (hs)	Recuento							
	M384 Barilla	M403 La5	M406 Sp1	M405 Yomo	MB29	M426 Mila	B1835	RE11
0	9,15	8,25	8,18	8,25	8,25	8,28	8,78	8,52
1	9,15	8,33	8,21	8,11	7,59	8,14	8,08	8,54
4	8,88	sin datos	8,22	7,87	8,03	8,20	7,44	8,49
% Supervivencia después de 1 h	100	101	100	98,29	92,07	98,28	92,03	100
% Supervivencia después de 4 hs	97,07	sin datos	100	95,43	97,40	99,04	84,77	99,65

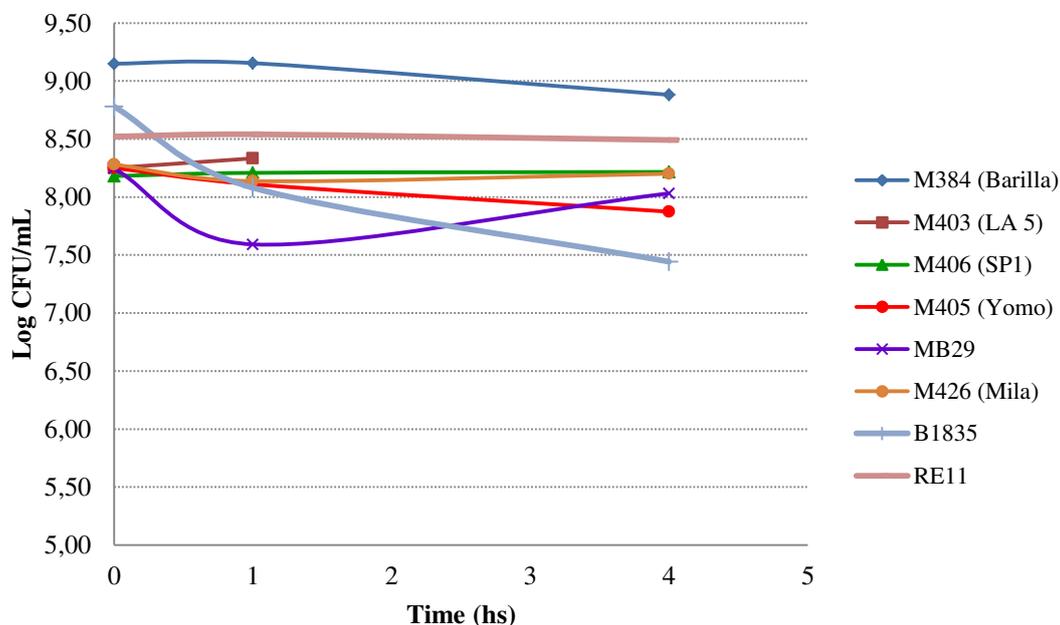


Figura IV.66. Supervivencia de cepas de lactobacilos y bifidobacterias a Bilis 2%.

De acuerdo con los resultados las cepas comerciales La5 y M426 (Mila) y la proveniente de la colección Scardovi MB29 y son las cepas más resistentes al ambiente hostil del estómago y el intestino delgado, disminuyendo como máximo 1 orden logarítmico (OL). Las demás cepas testeadas mostraron buena resistencia a las sales biliares, con 1 OL de disminución como máximo. Sin embargo, sólo algunas cepas mostraron buena resistencia al bajo pH, siendo éste el punto crítico que define la supervivencia o no de la mayoría de las cepas a las condiciones gastrointestinales.

Por otro lado, un requisito clave para las cepas probióticas es que no deben contener genes resistentes a antibióticos transmisibles. La ingestión de las bacterias que llevan tales genes no es deseable como la transferencia horizontal de genes a las bacterias receptores en el intestino ya que podría conducir al desarrollo de nuevos agentes patógenos resistentes a los antibióticos. Aunque los mecanismos de transferencia horizontal de genes en el intestino no se comprenden bien, el riesgo de que esto ocurra, aumenta si las bacterias donantes ingeridas sobreviven en el intestino en grandes cantidades, como es el caso con los probióticos (Zhou, 2005).

La resistencia o sensibilidad de cada cepa a los antibióticos seleccionados y las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) se muestran en la tabla IV.46.

Tabla IV.46. Concentración inhibitoria minima (CIM, $\mu\text{g.mL}^{-1}$) de varios antibióticos testeados para las cepas seleccionadas. Las cepas se caracterizaron como sensibles (S) o resistentes (R) de acuerdo a los puntos de corte definidos por la guía EFSA (2008).

Cepas	Antibióticos ^a															
	AMP		CEF		CHL		ERY		KAN		STR		TET		VAN	
M384 (Barilla)	1	S	16	S	>256	R	2	S								
M403 (La5)	1	S	16	S	8	R	4	R	>256	R	64	R	4	S	2	S
M406 (Sp1)	>256	R	>256	S	>256	R	>256	n.r.								
M405 (Yomo)	>256	R	>256	S	>256	R	>256	n.r.								
MB29	1	S	2	S	4	S	1	R	>256	R	128	S	4	S	1	S
M426 (Mila)	1	S	2	S	4	S	1	R	>256	R	128	S	16	S	1	S
RE11	2	S	2	S	32	R	32	R	>256	R	>256	R	4	S	16	S
B1835	2	S	2	S	32	R	32	R	>256	R	>256	R	4	S	8	R

^a AMP = Ampicilina, CHL = Cloranfenicol, ERY = Eritromicina, TET = Tetraciclina, VAN = Vancomicina, KAN = Kanamicina, STR = Estreptomicina, CEF = Cefuroxima; n.r. = no requerido.

Todas las cepas resultaron sensibles a Cefuroxima y resistentes a Eritromicina y Kanamicina, comparando con los valores informados por la Guía EFSA (2008). Las cepas de *L. rhamnosus* (Yomo y Sp1) fueron las únicas resistentes a Ampicilina. *B. animalis* ssp. *lactis* MB29 y M426 (aislado de Mila) resultaron las más sensibles a todos los antibióticos estudiados. Todas las bifidobacterias mostraron sensibilidad frente a Tetraciclina y Ampicilina. *B. longum* ssp. *longum* B1835 fue la única resistente a Vancomicina. La ocurrencia de una minoría de lactobacilos con resistencia atípica indeseable a ciertos antibióticos (principalmente para aquellos aislados de los productos comerciales) demuestra que no todas las cepas pueden ser utilizadas como probióticos.

En base a la resistencia a los antibióticos MB29 y M426 (Mila) son las cepas más interesantes para ser utilizadas en la industria de la alimentación, debido a que demostraron menor resistencia a un amplio espectro de antibióticos.

IV.4.4. VIABILIDAD DE CEPAS PROBIÓTICAS EN LECHE FERMENTADAS Y RESISTENCIA A CONDICIONES GASTROINTESTINALES SIMULADAS LUEGO DE SU INCORPORACIÓN A LA MATRIZ DEL ALIMENTO.

Se seleccionaron aquellas cepas con mayor interés tecnológico y otras comerciales (a fines comparativos) para ser utilizadas en la formulación de leches fermentadas y observar su viabilidad después de la exposición a bajo pH + pepsina y bilis 2% a los 5 y 30 días después de la fermentación (tabla IV.47.). También se determinó el recuento de células iniciales a tiempo 0 (antes del tratamiento).

A los 5 días de almacenamiento de las leches fermentadas, los recuentos iniciales (antes de los tratamientos) fueron superiores a 10^8 UFC/g. Por su parte, *B. animalis* ssp. *lactis* MB29 fue la que demostró mayor resistencia a bajo pH (98% supervivencia), ocurriendo lo contrario con *L. rhamnosus* Sp1 (42%). En el caso del tratamiento con bilis 2%, la viabilidad fue superior al 95% para los lactobacilos y MB29. Aunque *B. longum* ssp. *longum* B1835 fue la más sensible a las sales biliares, la reducción en la viabilidad fue menor a 1 orden logarítmico. Después de 30 días de almacenamiento a 5°C, no se encontraron diferencias en los recuentos iniciales de los productos elaborados con M384 (Barilla), Sp1 y MB29, comparando con los valores iniciales del día 5. Sin embargo, se observó una reducción significativa de la viabilidad en el producto con B1835. Luego de los tratamientos a bajo pH y bilis, la supervivencia de las cepas fue mayor al 90%, con la excepción de B1835 (donde no se obtuvieron recuentos) (figura IV.67.).

La bibliografía consultada resalta que una correcta elección de la matriz alimenticia para la cepa probiótica puede aumentar la supervivencia microbiana a los jugos gástricos, debido a la capacidad buffer o efecto protector de este tipo de productos fermentados (Charteris y col., 1998). Esto resulta importante para mantener los microorganismos en una matriz adecuada durante la vida útil, hasta que el alimento sea consumido.

Tabla IV.47. Viabilidad ($\log \text{UFC.g}^{-1}$) y porcentaje de supervivencia (%Sup.) de cepas de lactobacilos y bifidobacterias en leches fermentadas durante el almacenamiento y expuestas a condiciones gastrointestinales simuladas.

Cepas	Tiempo = 5 días					Tiempo = 30 días				
	Tiempo inicial ($\log \text{UFC.g}^{-1}$)	PBS pH 2,5 + pepsina (90 min)		PBS pH 8 + bilis 2% (4 Hs)		Tiempo inicial ($\log \text{UFC.g}^{-1}$)	PBS pH 2,5 + pepsina (90 min)		PBS pH 8 + bilis 2% (4 hs)	
		$\log \text{UFC.g}^{-1}$	%Sup.	$\log \text{UFC.g}^{-1}$	%Sup.		$\log \text{UFC.g}^{-1}$	%Sup.	$\log \text{UFC.g}^{-1}$	%Sup.
M384 (Barilla)	8,45	4,81	57,01	8,49	100,49	7,87	7,74	98,41	7,77	98,74
M406 (Sp1)	8,65	3,65	42,24	8,74	101,03	8,77	7,95	90,65	8,48	96,70
MB29	8,52	8,36	98,03	8,20	96,25	8,20	7,92	96,55	7,83	95,49
B1835	8,33	4,22	50,67	7,07	84,90	3,34	-	-	-	-

En la figura IV.67. se puede observar como las cepas de lactobacilos testeadas (Barilla y Sp1) adquieren resistencia ácida durante el almacenamiento, mientras que B1835 no logra sobrevivir. Tanto para los lactobacilos como MB29, la viabilidad después de la exposición a bilis no fue afectada.

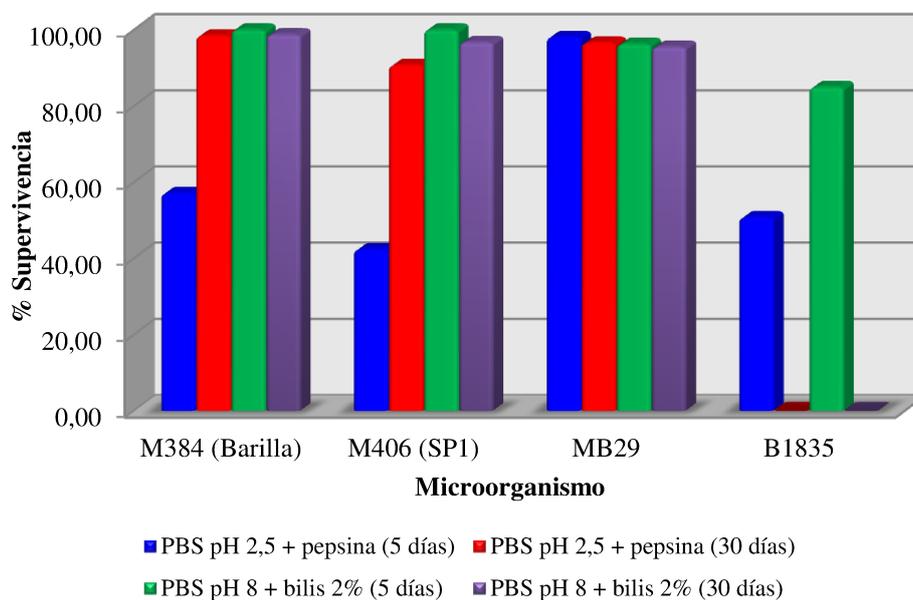


Figura IV.67. Porcentaje de supervivencia a condiciones gastrointestinales simuladas de cepas probióticas adicionadas a leches fermentadas durante el almacenamiento (5 y 31 días).

Los valores de pH iniciales para los productos rondaron en 5; mientras que a fines del periodo de aptitud, presentaron variaciones diversas. Ocurriendo la mayor variación para la leche fermentada adicionada con *L. acidophilus* M384 (Barilla), sin embargo, su viabilidad y resistencia no resultó comprometida a fines de la vida útil por la acidez de la matriz. Para la leche fermentada adicionada con *B. longum* ssp. *longum* B1835, el pH permaneció prácticamente constante hasta fines del almacenamiento, y sin embargo, fue ésta la cepa que menor viabilidad y resistencia presentó en la evaluación final.

Exceptuando *B. longum* ssp. *longum* B1835, todas las cepas mostraron buena resistencia, tanto a condiciones ácidas y bajo la acción de una enzima digestiva, como a la bilis.

En general se observó una mayor viabilidad de las cepas, luego de los diferentes tratamientos, cuando las mismas estuvieron contenidas en las matrices alimentarias, esto se debió probablemente a la capacidad de los diferentes componentes de las matrices para proteger a las células microbianas.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo, *L. acidophilus* M384 (Barilla) y *B. animalis* ssp. *lactis* MB29 serían las cepas de la colección Scardovi de mayor interés para ser incorporadas en la elaboración de leches fermentadas funcionales, habiendo mostrado buena viabilidad y resistencia a las condiciones gastrointestinales simuladas durante todo el período de aptitud de los productos.

Por otro lado, quedaría determinar la posible utilización de la goma espina corona como potencial compuesto prebiótico. Dentro de los análisis que quedarían por realizar sería importante ver si la goma inhibe bacterias indeseables (como *E. coli*, entre otras).

Capítulo V

Conclusiones

Se elaboraron leches fermentadas probióticas con un contenido de colesterol remanente menor a 5 mg%, logrando un 86% de extracción promedio del mismo, manteniendo de esta manera la grasa láctea y reduciendo significativamente el contenido de este compuesto.

El recuento del microorganismo probiótico utilizado (*L. rhamnosus* Sp1) fue siempre superior a 10^7 UFC.g⁻¹ durante toda la vida útil del producto; estas concentraciones fueron mayores al nivel sugerido para un alimento probiótico (10^6 UFC.g⁻¹). De esta manera, se garantiza la dosis mínima requerida para poder clasificar como “Alimento con probiótico” según la legislación en el Código alimentario Argentino.

Los diseños experimentales planteados (casos de estudio 1 y 2) resultaron muy útiles para evaluar el comportamiento de las diferentes respuestas estudiadas en función de las variables utilizadas. Se obtuvieron modelos matemáticos apropiados que permitieron predecir y describir el comportamiento de los sistemas en el espacio experimental estudiado. Así mismo, se pudieron optimizar las formulaciones de hidrocoloides a través de la función de deseabilidad con el fin de obtener leches fermentadas del tipo yogur-batido y yogur-firme, con adecuadas características sensoriales, texturales, reológicas y físicas.

Por otra parte, se obtuvieron gráficas sigmoidales para la evolución del pH y acidez durante la fermentación en ambos casos de estudio, que evidencian la influencia del metabolismo de las bacterias ácidolácticas en la formación de compuestos ácidos (principalmente ácido láctico) que disminuyen el pH y aumentan la acidez, lo que provoca la desestabilización de las micelas y por consiguiente, la formación del coágulo. Este comportamiento se verifica con menor intensidad durante el almacenamiento, produciéndose la estabilización de ambos parámetros hacia el fin de la vida útil debido a las condiciones de refrigeración y a la acumulación de metabolitos que inhiben a las propias bacterias.

Respecto al estudio de la cinética de acidificación durante la fermentación, para el caso de estudio 1 (influencia de hidrocoloides), se comprobó que el aumento de G y GEC aumentó significativamente la velocidad máxima de acidificación de las bacterias iniciadoras, resultando en tiempos de fermentación menores para llegar al punto de corte (pH = 5). Lo contrario se observó para el caso de estudio 2 (influencia de variables tecnológicas involucradas en los procesos de coagulación como son la concentración de CAL y CAS), la velocidad de fermentación se vio disminuida a una mayor

concentración de CAL y menor contenido de WPC (mayor CAS), posiblemente debido a la capacidad buffer del calcio y a que el WPC tiene efecto promotor de acidificación.

Se logró caracterizar la composición química promedio de cada muestra en ambos casos de estudio, necesaria para el estudio del valor nutricional del alimento a ser consumido.

La actividad acuosa no presentó diferencias significativas entre muestras, en ambos casos de estudio, presentando un valor muy elevado, característico de los productos con alta humedad, que favorece la viabilidad de los microorganismos iniciadores y probiótico.

El empleo de los hidrocoloides, CAL y LPD/WPC favoreció la formación de un coágulo muy estable, con mínima sinéresis (muy elevada retención de agua), evidenciándose la interacción sinérgica de las variables en ambos casos de estudio.

Por otra parte, el análisis reológico demostró la dependencia de los parámetros en estudio con las variables del diseño, ejerciendo un mayor efecto G y CAL sobre los mismos, para cada uno de los diseños experimentales 1 y 2, respectivamente.

Se comprobó que ambas variables producen un alejamiento al comportamiento de un fluido Newtoniano ($n = 1$), ya que un incremento en la concentración de dicho hidrocoloide o del mineral generó una disminución en el valor de n .

Se encontraron modelos simplificados para los parámetros K , μ_{ap50} , A , B e IT , en los cuales la G y el CAL (para cada caso de estudio) gobiernan la variación de los mismos, influyendo directamente, al igual que la GEC, pero ésta última en menor medida. Cuando las concentraciones de G y GEC o CAL aumentaron, fue necesario un mayor esfuerzo de corte (acción mecánica) para comenzar a deformar la muestra y para romper su estructura. Además, se incrementa la consistencia y la viscosidad aparente, como así también el desarrollo de enlaces del tipo no covalentes que promueven la tixotropía. Por su parte, el AMM demostró ser el de menor capacidad espesante, comparado a los otros dos hidrocoloides.

Asimismo, con las formulaciones de hidrocoloides utilizadas, se pudieron obtener leches fermentadas de diferentes consistencias, abarcando todo el rango existente en el mercado (bebible, batida y firme). Durante el estudio de las variables tecnológicas de coagulación, la consistencia obtenida fue intermedia ya que se utilizaron concentraciones constantes de hidrocoloides y las variables estudiadas, si bien influyeron, no produjeron un amplio rango de variación en los puntajes de consistencia sensorial de las leches fermentadas.

El perfil de textura instrumental resultó una técnica útil para evaluar la dureza y adhesividad y cohesividad de las muestras, pero no resultó adecuado en el caso de la elasticidad, gomosidad y masticabilidad, posiblemente debido a que al tratarse de producto semisólido su estructura se funde rápidamente en la boca y no se llega a masticar como ocurriría en el caso de un queso.

La caracterización sensorial permitió establecer el perfil de textura subjetivo de cada leche fermentada, y conocer la variación de los atributos evaluados en función de las variables en estudio. Para el caso de estudio 1, la consistencia sensorial fue influenciada directamente por G, en coincidencia con las evaluaciones reológicas. La cremosidad varió, incrementándose, con el aumento de la concentración de los 3 estabilizantes. En el caso de la aspereza y astringencia, se destaca la importancia de GEC en la reducción de su percepción (enmascaramiento), cuando sus concentraciones son máximas en la formulación de las leches fermentadas, contrastando con el efecto opuesto, aunque leve, de G y AMM sobre este atributo. Para el caso de estudio 2, el CAL fue el que demostró ejercer una mayor influencia sobre la consistencia sensorial y conjuntamente con el aumento de LPD aumentaron la cremosidad de las leches fermentadas obtenidas. Tanto la aspereza como la astringencia alcanzaron puntajes bajos en todas las evaluaciones para ambos casos de estudio.

Durante la vida de anaquel (almacenamiento), tanto la consistencia como la cremosidad permanecieron prácticamente constantes en cada experiencia; en cambio, la aspereza y astringencia, generalmente, aumentaron levemente. Tal variación estaría atenuada en aquellas experiencias con mayor contenido de GEC, debido a su efecto enmascarador, anteriormente descripto.

Respecto a los descriptores de *flavor* se concluye que no se encontraron comportamientos definidos en función de las variables estudiadas para los dos diseños propuestos. Se observaron puntajes bajos y discontinuos en el caso del sabor a “suero”, “leche en polvo” y “crema”, siendo percibidos por pocos evaluadores. En cambio, el gusto a ácido y dulce se encontró por lo general, en forma moderadamente perceptible y más del 80% de los panelistas los detectaron. El sabor a cocido se detectó en muy pocas muestras y en baja intensidad.

Los defectos sensoriales encontrados fueron en su mayoría calificados como “apenas perceptibles”, concluyendo que se encuentran mayormente asociados al proceso de elaboración y no a las variables en estudio, tal como ocurriría también con algunos de los descriptores de *flavor* (“leche en polvo” y “cocido”).

Generalmente, las características sensoriales se conservan durante la vida de anaquel, lo que permite asegurar la calidad y estabilidad sensorial de las leches fermentadas durante este período.

Las propiedades de los hidrocoloides y condiciones de coagulación investigados estarían permitiendo al consumidor acceder a un producto que presenta las mismas características texturales durante todo el almacenamiento; es decir, la calidad textural (instrumental y sensorial) del producto se mantiene estable durante la vida de anaquel gracias a una combinación adecuada de estas variables. Esta evidencia, de gran importancia industrial, podría estimular la utilización de la goma espina corona, de uso no convencional, junto con la gelatina de manera tal de favorecer el empleo de espesantes/estabilizantes nacionales, con la consecuente reducción de costos y desarrollo industrial de la región de donde es oriunda (chaqueña), permitiendo disminuir el desempleo y la pobreza.

Por otra parte, existe un creciente interés para influir positivamente la microbiota intestinal humana a través del uso de probióticos y/o prebióticos en la dieta. Los productos disponibles en el mercado, deben contener cantidades mínimas de microorganismo probiótico para considerar que lleguen en número adecuado al intestino. En esta investigación se comprobó que uno de los productos presentes en el mercado europeo no cumplía con tales exigencias, siendo el recuento de células viables inferior a 10^5 UFC.mL⁻¹.

Los medios de cultivos selectivos utilizados para el aislamiento de microorganismos probióticos presentes en productos comerciales resultaron adecuados, siendo TPY-mupirocina el medio óptimo para el crecimiento de bifidobacterias y MRS en el caso de lactobacilos. Variando las condiciones del MRS, por ejemplo pH 5,4 o el uso de bilis o ATB vancomicina, permitió el aislamiento de diferentes especies de lactobacilos.

El empleo de diferentes técnicas de PCR permitió la identificación molecular de todos las especies testeadas, siendo una herramienta útil, que se prefiere por sobre la caracterización fenotípica.

Los prebióticos comerciales FOS y GOS fueron los sustratos fermentados por el mayor número de especies estudiadas, mientras que la GEC resultó una novedosa fuente de carbohidratos utilizada por algunas cepas de bifidobacterias.

El bajo pH es el principal tratamiento que limita la viabilidad de los microorganismos cuando se los somete a condiciones gastrointestinales simuladas. En contraste, no se observaron cambios significativos frente a la exposición de sales

biliares, con excepción de *B. longum* ssp. *longum* B1835 que resultó ser la más sensible de todas las cepas testeadas.

Algunas cepas comerciales resultaron ser resistentes a varios antibióticos, por lo cual puede ser un inconveniente su consumo.

Las leches fermentadas incrementaron la resistencia ácida de las cepas testeadas durante el almacenamiento, resultando ser una matriz óptima de supervivencia para las mismas.

Si bien *L. acidophilus* M384 (Barilla) dio resistencia a algunos antibióticos, sería una cepa de interés tecnológico, junto con *B. animalis* ssp. *lactis* MB29 para ser incorporadas en la elaboración de leches fermentadas, ya que mostraron buena viabilidad frente a pH bajo y sales biliares.

Teniendo en cuenta la creciente preocupación de la sociedad por una alimentación más saludable, toma importancia el desarrollo y estudio de productos que además conserven adecuadas características de textura y sensoriales, para conservar o elevar la aceptabilidad por parte de los consumidores. Por lo tanto, se concluye que se ha logrado obtener y caracterizar leches fermentadas con características apreciables, debido a que mantienen la viabilidad del microorganismo probiótico utilizado, conservan la grasa láctea con todos sus beneficios (con muy bajo nivel de colesterol) y, además, están adicionadas con aminoácidos esenciales (proteínas de suero) y estabilizantes que mantienen la calidad nutricional, textural y sensorial.

CONSIDERACIONES FINALES – PERSPECTIVAS FUTURAS

Son varias las etapas que debe cumplir el desarrollo de un alimento desde su formulación inicial hasta su comercialización como producto final. No obstante, uno de los factores determinantes es el costo final del mismo. En este sentido, puede observarse que la extracción de colesterol de la leche con β -CD tendría un impacto del 20% aproximadamente, respecto al monto de venta, lo cual hace viable desde el punto de vista económico el desarrollo de leches fermentadas con colesterol reducido.

Por otro lado, sería conveniente realizar ensayos de aceptabilidad general de las leches fermentadas elaboradas, con evaluadores no entrenados (consumidores), para cuantificar el impacto en el sector de la sociedad hacia el cual van dirigidos estos productos.

Si bien aquí se encontraron datos muy interesantes con respecto al comportamiento reológico de los sistemas, sería conveniente completar la investigación con estudios de microestructura para dilucidar el tipo de interacciones entre las variables estudiadas, dentro de la matriz.

La expansión comercial actual en el uso de bacterias probióticas y compuestos prebióticos deben ir acompañados de estudios en profundidad de cómo pueden ser influenciados por factores inherentes a los procesos tecnológicos, el entorno fisicoquímico de los alimentos y el tránsito gastrointestinal. En este sentido, en el presente trabajo se ha logrado realizar el control de la viabilidad celular dentro de la matriz formulada y frente a condiciones gastrointestinales simuladas. Sin embargo, esto debería ser complementado con una evaluación de la funcionalidad de la cepa incluida en el alimento, para garantizar el efecto beneficioso sobre la salud del probiótico adicionado, y evaluar su eficacia en los consumidores, siendo necesario reforzar el trabajo con ensayos clínicos, con modelos experimentales “in vivo” en animales, que confirmen científicamente la efectividad funcional del alimento.

Por último, resulta interesante destacar que no sólo la goma espina corona ha resultado útil como un nuevo espesante posible de utilizar en la formulación de los alimentos sino que deberían profundizarse los estudios sobre su posible capacidad prebiótica. Para ello, uno de los ensayos a realizar debería ser determinar si tiene la capacidad de inhibir a otros microorganismos patógenos y ampliar el espectro de cepas probióticas estudiadas para ver si estimula su crecimiento y/o actividad.

Capítulo VI

Bibliografía

- Alais, C. (2003). *Ciencia de la leche. Principios de técnica lechera*. 4ta. ed. Ed. Reverté. Barcelona, España.
- Alander, M.; Satokari, R.; Korpela, R.; Saxelin, M.; Vilpponen, T. y Mattila, T. (1999). *Persistence of colonization of human colonic mucosa by a probiotic strain, Lactobacillus rhamnosus, after oral consumption*. Appl. Environ. Microbiol. 65: 351-354.
- Alonso, L.; Cuesta, P. y Gilliland, S.E. (2009). *Effect of β -cyclodextrin on trans fats, CLA, PUFA and phospholipids of milk fat*. J. Am. Oil Chem. Soc. 86: 337-342.
- Amatayakul, T., Halmos, A. L., Sherkat, F. & Shah, N. P. (2006). *Physical characteristics of yoghurts made using exopolysaccharide producing starter cultures and varying casein to whey protein ratios*. Int. Dairy J. 16: 40-51.
- Amatayakul, T.; Sherkat, F. y Shah P. (2006). *Syneresis in set yogurt as affected by ESP starter cultures and levels of solids*. Int. J. Dairy Technol. 59(3): 216-221.
- AOAC. (1984). *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (AOAC)*. (14ta ed.). Virginia, USA.
- AOAC. (1995). *Official Methods of Analysis of AOAC*. (16ta ed.) Vol. II. Virginia, USA.
- Ashwell, M. (2004). *Conceptos sobre los alimentos funcionales*. International Life Sciences Institute (ILSI) Spanish translation. Brusellas: ILSI Press.
- Astray, G.; Gonzalez Barreiro, C.; Mejuto, J. C.; Rial Otero, R. y Simal Gándara, J. (2009). *A review on the use of cyclodextrins in foods*. Food Hydrocolloids. 23: 1631-1640.
- Badui Dergal, S. (2006). *Química de los alimentos*. Cuarta edición. Pearson. México.
- Barnes, H. A. (1997). *Thixotropy – a review*. J. Non-Newtonian Fluid Mech. 70: 1-33.
- Baró, L.; Jiménez, J.; Martínez Férrez, A. y Bouza, J. J. (2001). *Péptidos y proteínas de la leche con propiedades funcionales*. Ars. Pharmaceutica. 42 (3-4): 135-145.
- Barreto Penna, A. L; Converti, A. y Nogueira de Oliveira M. (2006). *Simultaneous Effects of Total Solids Content, Milk Base, Heat Treatment Temperature and Sample Temperature on the Rheological Properties of Plain Stirred Yogurt*. Food Technol. Biotechnol.44 (4): 515-518.
- Basak, S. & Ramaswamy, H. S. (1994). *Simultaneous evaluation of shear rate and time dependency of stirred yogurt rheology as influenced by added pectin and strawberry concentrate*. J. Food Eng. 21(3): 385-393.
- Bello Gutiérrez, J. (2000). *Ciencia bromatológica: principios generales*. Ediciones Díaz de Santos. Madrid, España.

- Bergey, D. H.; Breed, B. W.; Hammer, F.M.; Huntoon, E. G.; Murray, E.G. y Harrison, F.C. (2011). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, novena edición. The Williams & Wilkins Co, Baltimore.
- Biavati, B.; Mattarelli, P. (2006). The family *Bifidobacteriaceae*. En: Dworkin, M.; Hansen, P.A.; Lessel, E. F. (Eds.). *The Prokaryotes: Archaea: Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes*, vol.3. Springer-Verlag, New York, pp. 322-382.
- Bolivar Forero, C. P. (2009). *Monografía sobre el galactomanano del grano de café y su importancia en el procesamiento para la obtención de café soluble*. Monografía (Tecnicultura). Universidad Tecnológica de Pereira. Colombia.
- Borda, M. A. (2011). *Formulación de una base para aderezo de ensaladas con características de alimento funcional*. Tesis de Maestría en Tecnología de Alimentos. Universidad Tecnológica Nacional, Buenos Aires.
- Bourne, M. C. (1982). *Food Texture and Viscosity. Concept and Measurement*. Academic Press, New York, USA. falta completar?
- Bourne, M. C. (2002). *Food texture and viscosity: concept and measurement*. New York: Academic Press.
- Brito, C. (2009). *Revaloración de la funcionalidad fisiológica de la leche y los lácteos: estudios de optimización*. *Agro. Sur*. 37(2): 71-80.
- Cabeza Herrera, E. (2006). *Bacterias ácido lácticas: aplicaciones como cultivos estarter para la industria láctea y cárnica*. Simposio Regional de Microbiología "Microorganismos Eficientes en el Sector Productivo", Universidad Libre. Colombia. [En línea] http://academia.edu/992789/Bacterias_acido-lacticas_BAL_aplicaciones_co
- Calderón, O.; Padilla, C.; Chaves, C.; Villalobos, L. y Arias, M.L. (2007). *Evaluación del efecto del cultivo probiótico *Lactobacillus rhamnosus* adicionado a yogurt natural y con probióticos comerciales sobre poblaciones de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis**. *ALAN*, 57: 1-6.
- Cardelle Cobas, A.; Corzo N.; Olano A.; Peláez C.; Requena T.; Ávila, M. (2011). *Galactooligosaccharides derived from lactose and lactulose: Influence of structure on *Lactobacillus*, *Streptococcus* and *Bifidobacterium* growth*. *Int. J. Food Microbiol.* 149: 81-87.
- Carrapiso, M. R.; Aguayo, C. y Carrapiso, A. I. (2004). *Efecto de la grasa sobre el flavour de leche con un aromatizante de vainilla*. *Cienc. Tecnol. Aliment.*, 4(4): 246-250.

- Castillo, S.; Bonneau, G.; Sánchez, A.; Ceballos, B.; Malarczuk, C.; Medina, G. y Castillo, C. (2005). *Factores de riesgo aterogénico y síndrome metabólico. Estudio en un grupo de empleados públicos hospitalarios de Posadas, Misiones, Argentina*. Acta Bioquím. Clín. Latinoam. 39(4), 445-452.
- Cerezo, A. (1965). *The constitution of a galactomannan from the seed of Gleditsia amorphoides*. J. Org. Chem. 30(3): 924-927.
- Charteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L. y Collins, J. K. (1998). *Ingredient selection criteria for probiotic microorganisms in functional dairy foods*. Int. J. Dairy Technol., 51(4), 123-136.
- Charteris, W.; Kelly P.; Morelli L.; Collins, J. (1998). *Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic Lactobacillus and Bifidobacterium species in the upper human gastrointestinal tract*. J. Appl. Microbiol. 84: 759 – 768.
- Cheng, H. (2010). *Volatile flavor compounds in yogurt: a review*. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 50: 938-950.
- Cóccaro, G. C. (2010). *Desarrollo de nuevos productos: Alimentos funcionales y novel food. Alternativas para el diseño de alimentos y su marco legal*. [En línea] [http://www.alimentosargentinos.gov.ar/contenido/procal/estudios/02/DesarrolloNuevosPr oductos.pdf](http://www.alimentosargentinos.gov.ar/contenido/procal/estudios/02/DesarrolloNuevosProductos.pdf) [Consultado: junio, 2013.].
- Código Alimentario Argentino. (2010). Resolución Conjunta 40/2004-SPRRS y 298/2004-SAGPA. [En línea] <<http://www4.neuquen.gov.ar/salud/images/archivo/Bro>
- Cole, C. G. B. (2000). *Encyclopedia of food science and technology*. 2da. ed. Vol. IV. Ed. John Wiley & Sons. Nueva York, EEUU.
- Condon Salcedo, R.; Mariné Font, M. y Rafecas Martínez, M. (1988). *Yogur: elaboración y valor nutritivo*. Fundación Española de la Nutrición. Serie “Divulgación”, 10.
- Contarini, G.; Povo, M.; Bonfitto, E. y Berardi, S. (2002). *Quantitative analysis of sterols in dairy products: experiences and remarks*. Int. Dairy J. 12(7): 573-578.
- Cornes, R. (2008). *Los Beneficios de los Lácteos para la Salud Humana*. <http://www.fepale.org/lechosalud/documentos/RafaelCornesDocpara%20SitioSialaLeche.pdf> [Consultado: enero, 2011].
- Corry J.; Curtis G. and Baird, R. (2011). *Handbook of Culture Media for Food and Water Microbiology*. 3rd edition. RSC Publishing, UK.

- Coşkub, F. y Şenoğlu, C. (2011). *The effect of using different levels of calcium carbonate on the physical, chemical and sensory properties of yogurt*. *Gıda* 36 (3): 129-135.
- Cruz, A. G., Castro, W. F., Faria, J. A. F., Lollo, P. C. B., Amaya-Farfán, J., Freitas, M. Q., Rodrigues, D., Oliveira, C. A. F. & Godoy, H. T. (2012). *Probiotic yogurts manufactured with increased glucose oxidase levels: Postacidification, proteolytic patterns, survival of probiotic microorganisms, production of organic acid and aroma compounds*. *J. Dairy Sci.* 95, 2261-2269.
- Damin, M.; Alcântara, M.; Nunes, A. y Oliveira, M (2009). *Effects of milk supplementation with skim milk powder, whey protein concentrate and sodium caseinate on acidification kinetics, rheological properties and structure of nonfat stirred yogurt*. *J. Food Sci. Technol.* 42: 1744-1750.
- Dante, R. C., Escamilla, J. L., Madrigal, V., Theuss, T., Calderón, J., Solorza, O. y Rivera, R. (2003). *Fractional factorial design of experiments for PEM fuel cell performances improvement*. *Int. J. Hydrogen Energy.* 28(3): 343-348.
- Dave, R.I. y Shah, N.P. (1996). *Viability of yogurt and probiotic bacteria in yogurts made from commercial starter cultures*. *Int. Dairy J.* 7: 31-41.
- Davis, F. y Higson, S. (2011). *Macrocycles: construction, chemistry and nanotechnology applications*. John Wiley & Sons Ed. UK.
- Debon, J., Schiwinden Prudêncio, E., & Cunha Petrus, J. C. (2010). *Rheological and physico-chemical characterization of prebiotic microfiltered fermented milk*. *J. Food Eng.* 99: 128-135.
- Early, R. (2000). *Tecnología de los productos lácteos*. Ed. Acribia. Zaragoza. España.
- Enriquez Castillo, D. F. (2012). *Efecto de la concentración de sólidos totales de la leche entera y tipo de cultivo comercial en las características reológicas del yogurt natural tipo batido*. Tesis Ingeniería Industrial. Universidad Nacional de Trujillo. Perú.
- Everett, D. W. y McLeod, R. E. (2005). *Interactions of polysaccharide stabilizers with casein aggregates in stirred skim-milk yoghurt*. *Int. Dairy J.* 1175-1183.
- Farah, Z. y Fischer, A. (2004). *Milk and meat from the camel: handbook on products and processing*. Publicado por Die Deutsche Bibliothek. [En línea] <http://dnb.info/970391358> [Consultado: marzo, 2012].
- Ferrante, D.; Linetzky, B.; Konfino, J.; King, A.; Virgolini, M. y Laspiur, S. (2011). *Encuesta Nacional de factores de riesgo 2009: Evolución de la epidemia de enfermedades crónicas no transmisibles en Argentina*. *Rev. Argent. Salud Pública.* 2(6): 34-41.

- Ferré, J. (2002). *El diseño factorial completo 2k*. Grupo de Quimiometría y Cualimetría. Departamento de Química Analítica y Química Orgánica. Universidad Rovira i Virgili. Tarragona. [En línea] <http://www.quimica.urv.es/quimio> [Consultado: enero, 2011].
- Fiszman, S. M., Lluch, M. A., & Salvador, A. (1999). *Effect of addition of gelatin on microstructure of acidic milk gels and yoghurt and on their rheological properties*. Int. Dairy J. 9: 895-901.
- Fiszman, S.M. y Salvador, A. (1999). *Effect of gelatine on the texture of yogurt and of acid-heat-induced milk gels*. Z. Lebensm. Unters. Forsch. A. 208: 100-105.
- Fox, P. F. y McSweeney, P. L.H. (1998). *Dairy chemistry and biochemistry*. Blackie Academic and Professional, London, UK.
- Gallardo-Escamilla, F. J., Kelly, A. L., y Delahunty, C. M. (2007). *Mouthfeel and flavour of fermented whey with added hydrocolloids*. Int. Dairy J. 17: 308-315.
- Ganesh, S. (2006). *A novel yogurt product with Lactobacillus acidophilus*. Thesis (Master of Science). Louisiana State University. Estados Unidos.
- García-Lorda, P.; Salas-Salvado, J. y Cobo J. M. (2005). *Ingesta de calcio y obesidad*. Med. Clin. 124(12), 467-475.
- Garza Garza, S. (1999). *Caracterización reológica y microbiológica, y cinéticas de deterioro en cremogenado de melocotón*. Tesis Doctoral. Universidad de Lleida. España.
- Gaucheron, F. (2005). *The minerals of milk*. Reprod. Nutr. Dev. 45: 473-483.
- Gayoso, L. (2009). *Grasa beneficiosa de la leche: lípidos polares y su efecto protector contra enfermedades*. [En línea] http://www.sialaleche.org/pdf/lucia_gayoso.pdf [Consultado: enero, 2011].
- German, B.; Schiffrin, E. J.; Reniero, R.; Mollet, B.; Pfeifer, A. y Neeser, J. R. (1999). *The development of functional foods: lessons from the gut*. Trends Biotech. 17(12): 492-499.
- Gerstner, G. (2002). *El desafío de la fortificación*. Énfasis Alim. (4): 63- 65.
- Gerstner, G. (2005). *The new power of calcium*. Int. Food Ingrid. 1: 37-40.
- Gimpl, G. (2010). *Cholesterol-protein interaction: methods and cholesterol reporter molecules*. En *Cholesterol binding and cholesterol transport proteins: structure and function in health and disease*. Subcellular Biochemistry vol. 51. J. R. Harris (ed.). Springer, UK. 1-46.
- Gomes, A. A., Braga, S. P., Cruz, A. G., Cadena, R. S., Lollo, P. C. B., Carvalho, C., Amaya-Farfán, J. A. F., Faria, J. A. F. & Bolini, H. M. A. (2011). *Effect of the inoculation level of*

- Lactobacillus acidophilus* in probiotic cheese on the physicochemical features and sensory performance compared with commercial cheeses. *J. Dairy Sci.* 94: 4777-4786.
- Gomez Heras, J. C. (1999). *Métodos de control de acidez en yogur*. Tesis Ing. Agroindustrial. Universidad Autónoma de Chapingo, Departamento de Ingeniería Agroindustrial. México.
- Gómez Romero, M. (2010). *Desarrollo y evaluación de estrategias analíticas para la caracterización de compuestos bioactivos en alimentos funcionales*. Tesis Doctoral. Universidad de Granada, España. [En línea] <http://digibug.ugr.es/bitstream/10481/1546>
- Goncalvez, D.; Pérez, M.C.; Reolon, G.; Segura, N.; Lema, P.; Gámbaro, A.; Varela, P. y Ares, G. (2006). *Effect of thickeners on the texture of stirred yogurt*. *Alimentos e Nutrição*. 16: 1-8.
- Gonzales-Martinez, C. Becerra, M.; Cháfer, M.; Albors, A.; Carot, J. M. y Chiralt, A. (2002). *Influence of substituting milk powder on yogurt quality*. *Food Sci.Technol.* 13: 334-340.
- González Parada, Z.M. y Perez Sira, E.E. (2003). *Evaluación fisicoquímica y funcional de almidones de yuca (Manihot esculenta Crantz) pregelatinizados y calentados con microondas*. *ACV*. 54(2): 127-137.
- Gösta Bylund, M. (2003). *Manual de las industrias lácteas*. Ed. AMV. Madrid, España.
- Gottret, M. V.; Ostertag, C. F.; Alonso, L. y Laing, D. R. (1997). *Estudio de mercado de los diferentes usos de la yuca en Colombia: Informe final-primera Fase*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Proyecto de Desarrollo de Agroempresas Rurales, Cali, Colombia. [En línea] <http://biblioteca.arcobol.com/MER%20434.pdf> [Consultado: enero, 2011].
- Guglielmotti, D. M. (2003). *Fagos autóctonos de Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus: caracterización y descripción de su interacción con cepas sensibles*. Tesis Magíster en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Universidad Nacional del Litoral, Facultad de Ingeniería Química. Argentina.
- Gurmeet, S. y Kasiviswanathan, M. (2008). *Influence of calcium fortification on sensory, physical and rheological characteristics of fruit yogurt*. *J. Food Sci. Tech.* 41: 1145-1152.
- Gutiérrez Pulido, H. y de la Vara Salazar, R. (2008). *Análisis y diseño de experimentos*. Segunda edición. Mc Graw-Hill Interamerica Ed. 1-537.
- Halmos, A. L. & Tiu, C. (1981). *Liquid foodstuffs exhibiting yield stress and shear degradability*. *J. Text. St.* 12: 39-46.
- Hedges, A. R. (1998). *Industrial applications of cyclodextrins*. *Chem Rev.* 98(5): 2035-2044.

- Heller, K. J. (2001). *Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms*. Am. J. Clin. Nutr. 73(suppl): 374S-379S.
- Hollowski, V. C. (2011). *Propiedades funcionales selectas en proteínas de espina corona (Gleditsia amorphoides)*. Tesina Lic. en Biotecnología. Universidad Nacional del Litoral, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Argentina.
- Homsey, C. (2000). *Starch: stabilizer solutions*. Food Product Design. <http://www.foodproductdesign.com/articles/2000/09/starch-stabilizer-----solutions.aspx>.
- Hough, Guillermo. (2009). *Curso Taller de Evaluación Sensorial de Alimentos*. ISETA. INLAIN. UNL. Argentina.
- Huang, H.; Huang, S.; Chen, P.; King, A.; Lin, Y.; Tsen, J. (2007). *Basic characteristics of Sporolactobacillus inulinus BCRC 14647 for potencial probiotic properties*. Curr. Microbiol. 54: 396-404.
- Huginin, A. (2008). *Productos de Suero de Leche en Yogurt y Productos Lácteos Fermentados*. Mundo Lácteo y Cárnico. Panorama. 4-8.
- Huppertz, T. y Kelly, A.L. (2006). *Physical chemistry of milk fat globules. Advanced Dairy Chemistry 2: Lipids*. 3ra Ed., Springer, New York. 173-212.
- Ibarra Corral, M. L. (2007). *Caracterización reológica de líquidos mediante un viscosímetro de tubo*. Memorias de residencia profesional Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico de Durango. México.
- IDF-FIL. (1992). *Norme générale de composition pour les laits fermentés*. Norme FIL Internationale Bruselas, Bélgica. 4: 163.
- Jenkins, D.J.; Axelsen, M.; Kendall, C. W.; Agustín, L. S.; Vuksan, V. y Smith, U. (2000). *Dietary fiber, lente carbohydrates and the insulin-resistant diseases*. Br. J. Nutr. 83(suppl 1):157S-163S.
- Johansen, S. M. B., Laugesen, J. L., Janhøj, T., Ipsen, R. H. y Frøst, M. B. (2008). *Prediction of sensory properties of low-fat yoghurt and cream cheese from surface images*. Food Qual. Pref. 19: 232-246.
- Johnson, M. E.; Kapoor, R.; J. McMahon, D. J.; McCoy, D. R.; y Narasimmon, R. G. (2009). *Reduction of sodium and fat levels in natural and processed cheeses: scientific and technological aspects*. Comprehensive Rev. Food Sci. Food Saf. 8: 252-268.
- Kalab, M., Emmons, D. y Sargant, A. (1976). *Milk gel structure. Microstructure of yoghurt as related to the heating of milk*. Milchwissenschaft. 31: 402-410.

- Kang, J. X. y Leaf, A. (2000). *Prevention of fatal cardiac arrhythmias by polyunsaturated fatty acids*. Am. J. Clin. Nutr. 71(suppl): 202S-207S.
- Kao, Y.; Liu Y. y Shyu Y. (2007). *Identification of Lactobacillus spp. in probiotic products by real-time PCR and melting curve analysis*. Food Res. Int. 40: 71-79.
- Kaplan, H. and Hutkins, R. (2000). *Fermentation of Fructooligosaccharides by Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria*. J. Appl. Environm. Microbiol. 66(6): 2682-2684.
- Karaka, O.B.; Saydam, I.B.; Kahyaoglu, T.; Unal, E., Erginkaya, Z.; Guven, M. (2013). *Textural properties and survival of Lactobacillus acidophilus, Streptococcus thermophilus y Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus of probiotic set yogurts produced by probiotic stabilizers and different molasses types*. J. Food Agr. Envir. 11: 199-203.
- Karazhiyan, H. Razavi, S. M. A., Phillips, G. O., Fang, Y., Al-Assaf, S., Nishinari, K., & Farhoosh, R. (2009). *Rheological properties of Lepidium sativum seed extract as a function of concentration, temperature and time*. Food Hydrocolloids. 23: 2062-2068.
- Karazhiyan, H., Razavi, S. M. A., & Phillips, G. O. (2011). *Extraction optimization of a hydrocolloid extract from cress seed (Lepidium sativum) using response surface methodology*. Food Hydrocolloids. 25: 915-920.
- Kaur, B.; Ariffin, F.; Bhat, R. y Karim, A.A. (2011). *Progress in starch modification in the last decade*. Food Hydrocolloids. 1-7.
- Kawase, M., Hashimoto, H., Hosoda, M., Morita, H. y Hosono, A. (2000). *Effect of administration of fermented milk containing whey protein concentrate to rats and healthy men on serum lipids and blood pressure*. J. Dairy Sci. 83(2), 255-263.
- Koocheki, A., Reza Taherian, A., Razavi, S. M. A., y Bostan, A. (2009). *Response surface methodology for optimization of extraction yield, viscosity, hue and emulsion stability of mucilage extracted from Lepidium perfoliatum seeds*. Food Hydrocolloids, 23: 2369-2379.
- Koop, L. (2001). *Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: a review*. J. Am. Diet. Assoc. 101: 229-241.
- Kristo, E.; Biliaderis, C.G. y Tzanetakis, N. (2003). *Modelling of rheological, microbiological and acidification properties of a fermented milk product containing a probiotic strain of Lactobacillus paracasei*. Int. Dairy J. 13:517-528.
- Kumar, P. y Mishra, H.N. (2004). *Mango soy fortified yoghurt: effect of stabilizer addition on physicochemical, sensory and textural properties*. Food Chem. 87: 501-507.

- Kwak, N. S. y Jukes, D. J. (2001). *Functional foods. Part 1: the development of a regulatory concept*. Food Control. 12: 99-107.
- Labin-Goldscher, R. y Edelstein, S. (1996). *Calcium citrate: a revised look at calcium fortification*. Food Tech. 50(6): 96-98.
- Lacroix, C. y Yildirim, S. (2007). *Fermentation technologies for the production of probiotics with high viability and functionality*. Curr. Opin. Biotech. 18: 176-183.
- Lal, S.N.D.; O'Connor, C.J. y Eyres, L. (2006). *Application of emulsifiers/stabilizers in dairy products of high rheology*. Adv. Colloid Interface Sci.123-126: 433-437.
- Lee, D. K.; Ahn, J. y Kwak, H. S. (1999). *Cholesterol removal from homogenized milk with β -Cyclodextrin*. J. Dairy Sci. 82(11): 2327-2330.
- Lee, H. y Lee, Y. (2008). *A differential medium for lactic acid-producing bacteria in a mixed culture*. Letters Appl. Microbiol. 46: 676-681.
- Lee, W. J., y Lucey, J. A. (2010). *Formation and physical properties of yogurt*. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 23(9): 1127-1136.
- Leveau, J. Y. y Bouix, M. (2000). *Microbiología Industrial: los microorganismos de interés industrial*. Ed. Acribia. Zaragoza, España.
- Lewandowicz, G.; Walkowski, A.; Blaszcak, W. (2004). *Degree of substitution of cross-linked starches vs. functionality in food products*. En Starch. Ed.Yuryev, et al. 75-95. averiguar editorial
- Liu, S.; Buring, J. E.; Sesso, H. D.; Rimm, E. B.; Willett, W. C. y Manson, J. E. (2000). *A prospective study of dietary fiber intake and risk of cardiovascular disease among women*. J. Am. Coll. Cardiol. 39(1): 49-56.
- Lourens Hattingh, A. y Viljoen, B. C. (2001). *Yogurt as probiotic carrier food: a review*. Int. Dairy J., 11(1-2), 1-17.
- Lucey, J. A. (2002). *Formation and physical properties of milk protein gels*. J. Dairy Sci. 85(2): 281-294.
- MacGibbon, A.K.H. y Taylor, M.W. (2006). *Composition and structure of bovine milk lipids*. En: *Advanced Dairy Chemistry 2: Lipids*, 3ra. Ed., Springer, New York. 1-35.
- Maiocchi, M. (2006). *Posible aprovechamiento de espina corona. Proyecto bosques nativos y áreas protegidas*. Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable de la Nación. [En línea]. <http://www.ambiente.gov.ar/archivos/web/PBVyAP/File/A3/PIARF>

- Manzoni, C. (2012). *El yogur se vende más y vuelve a ser más cremoso*. Artículo publicado en edición impresa del diario La Nación. [En línea] <http://www.lanacion.com.ar/1447908-el-yogur-se-vende-mas-y-vuelve-a-ser-cremoso> [Consultado: junio, 2013]
- Marafon, A.; Sumi, A.; Alcantara, M.; Tamime, A.; Oliveira, M. (2011). *Optimization of the rheological properties of probiotic yogurts supplemented with milk proteins*. LWT. 44: 511-519.
- Marcotte, M., Taherian Hoshahili, A. R., & Ramaswamy H. S. (2001). *Rheological properties of selected hydrocolloids as a function of concentration and temperature*. Food Res. Int. 34: 695-703.
- Martínez Icarte, R. M. (2002). Caracterización del comportamiento reológico de sopa crema orientada a control de calidad. Tesis de Grado. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile.
- Martinez, C. G.; Becerra, M.; Chafer, M.; Albor, A.; Carot, J. y Chiralt, A. (2003). *Influence of substituting milk powder for whey powder on yogurt quality*. Food Sci. Tech. 13: 334-340.
- Mason, W. R. (2009). *Starch use in foods*. En *Starch: chemistry and technology*, 3ra edn. USA. 745-788.
- Matsuki, T.; Watanabe, K.; Tanaka, R. (2003). *Genus- and species-specific PCR primers for the detection and identification of Bifidobacteria*. Curr. Issues Intest. Microbiol. 4: 61-69.
- Mayes, P. A. (1997). *Síntesis, transporte y excreción del colesterol*. En: *Química Biológica de Harper*. Capítulo 28, 14º Ed. Editorial El Manual Moderno, S. A. de C. V. México, D. F.
- McMurry, J. (2008). *Química orgánica*. 7ma ed. Ed. faltan editores y paginas. Thomson. México D.F.
- Mercanti, D.J. (2007). *Perfiles de lipólisis y características sensoriales de quesos semiduros con bacterias probióticas como fermento adjunto*. Tesis Doctoral. UNL. Santa fe, Argentina.
- Miller, G.D.; Jarvis, J. K. y McBean, L. D. (2001). *The importance of meeting calcium needs with foods*. J. Am. Coll. Nutr. 20(2): 168S-185S.
- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación. Subsecretaría de Lechería. (2011). [En línea] <http://www.alimentosargentinos.gob.ar/lacteos/>. [Consultado: junio, 2012].
- Ministerio de Salud de la Nación. (2006). *Primera Encuesta Nacional de Factores de Riesgo*. (1ª ed.). Argentina.
- Modesto, M.; Mattarelli, P.; Biavati, B. (2003). *Nutritional requirements of Bifidobacteriaceae strains isolated from human dental caries*. Ann. Microbiol. 53(2): 245-251.

- Montero Marín, A.; Sánchez, A. L.; Vargas, E. F. y Belmonte Cortés, S. (2006). *Estudio de declaraciones nutricionales y saludables en el etiquetado de leches fermentadas*. Nutr. Hosp. 21(3), 338-345.
- Montgomery, D. C. (1997). *Design and analysis of experiments*. 5th Edition. John Wiley & Sons, Inc. 1-680.
- Moreno Rojas, R. (2000). *Nutrición y dietética para tecnólogos de alimentos*. Ediciones Díaz de Santos. Madrid, España.
- Mori, K.; Yamazaki, K.; Ishiyama, T.; Katsumata, M.; Kobayashi, K.; Kawai, Y.; Inoue, N. (1997). *Comparative sequence analyses of the genes coding for 16S rRNA of Lactobacillus casei-related taxa*. Int. J. Syst. Bacteriol. 47 (1): 54-57.
- Morin, R.J.; Hu, B., Peng, S.K. y Sevanian, A. (1991). *Cholesterol oxides and carcinogenesis*. J. Clin. Lab. Anal. 5: 219-225.
- Muller, H. G. (1978). *Introducción a la reología de los alimentos*. Zaragoza, España. Ed. Acribia.
- Multon, J. L. (2000). *Aditivos y auxiliares de fabricación en las industrias agroalimentarias*. (2^a ed.). Zaragoza, España. Ed. Acribia.
- Myers, R. H. y Montgomery, D. C. (1995). *Response surface methodology. Process and product optimization using designed experiments*. Ed. John Wiley & Sons. New York, EEUU.
- O'Quinn, P.R; Nelssen, J.L. y col. (2000). *Conjugated linoleic acid*. Anim. Health Res. Rev. 1: 35-46.
- Ohama, H.; Ikeda, H. y Moriyama, H. (2006). *Health foods and foods with health claims in Japan*. Toxicology. 221: 95-111.
- Onega Pagador, M.E. (2003). *Evaluación de la calidad de carnes frescas: aplicación de técnicas analíticas, instrumentales y sensoriales*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. España.
- Ordóñez Pereda, J. A. (1998). *Tecnología de los alimentos. Vol. II: Alimentos de origen animal*. Madrid, España: Síntesis (Ed.).
- Oroian, M.; Gutt, S.; Gutt, G. (2011). *Influence of hydrocolloids on the rheological behavior of blueberries yogurt*. Annals of DAAAM for 2011 & Proceedings of the 22nd International DAAAM Symposium, Volume 22, No. 1, ISBN 978-3-901509-83-4.
- Ortega Rodríguez, M. (2009). *Comportamiento reológico de disoluciones acuosas de surfactantes comerciales no iónicos*. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. España.

- Osorio Tobón, J. F.; Ciro Velázquez, H. J. y Mejía, L. G. (2005). Caracterización *reológica y textural del queso Edam*. Rev. Dyna. 72(147): 33-45.
- Park, Y. W. (1999). *Cholesterol contents of U.S. and imported goat milk cheeses as quantified by different colorimetric methods*. Small Rumin. Res. 32(1): 77-82.
- Park, Y. W. (2000). *Comparison of mineral and cholesterol composition of different commercial goat milk products manufactured in USA*. Small Rumin. Res. 37(1): 115-124.
- Parodi, P.W. (2009). *Has the association between saturated fatty acids, serum cholesterol and coronary heart disease been over emphasized?* Int. Dairy J., 19: 345-361.
- Parra, R.A. (2009). *Lactosuero: importancia en la industria de alimentos*. Rev. Fac. Nal. Agr. 62(1): 4967-4982.
- Peng, S.K.; Hu, B. y Morin, R.J. (1991a). *Effects of cholesterol oxides on atherogenesis. Biological effects of cholesterol oxides*. Peng & Morin (Eds.). Boca Raton, London. 167–189.
- Peng, S.K.; Sevanian, A.; Morin, R.J. (1991b). *Cytotoxicity of cholesterol oxides*. En *Biological effects of cholesterol oxides*. Peng & Morin (Eds.). Boca Raton, London. 147–166.
- Phadungath, C. (2005). *Casein micelle structure: a concise review*. Songklanakarin J. Sci. Technol. 27(1): 201-212.
- Pirkul, T.; Temiz, A. y Erden, Y. K. (1997). *Fortification of Yoghurt with Calcium Salts and its Effect on Starter Microorganisms and Yoghurt Quality*. Int. Dairy J. 7: 547-552.
- Quintáns Riveiro, L. C. (2008). *Reología de productos alimenticios*. Memoria para optar al título de Doctora en Ciencias Químicas. Universidad de Santiago de Compostela. España.
- Ramasubramanian, L.; Restruccia, C.; Deeth, H. (2008). *Effect of calcium on the physical properties of stirred probiotic yogurt*. J. Dairy Sci. 91: 4164-4175.
- Ramírez Navas, J. S. (2006). *Introducción a la reología de los alimentos*. ReCiTeIA. 6(1): 1-45.
- Ranadheera, R.D.C.S.; Baines, S.K. y Adams, M.C. (2010). *Importance of food in probiotic efficacy*. Food Res. Int. 43: 1-7.
- Recio, I. y López-Fandiño, R. (2005). *Ingredientes y productos lácteos funcionales: bases científicas de sus efectos en la salud*. En *Alimentos funcionales*. FECYT (Ed.). Madrid. 23-102.
- Remeuf, F.; Mohammed, S.; Sodini, I. y Tissier, J. P. (2003). *Preliminary observations on the effects of milk fortification and heating on microstructure and physical properties of stirred yogurt*. Int. Dairy J. 13: 779-780.

- Requena, M.T.; Janer, C. y Peláez, M. (2005). *Leches fermentadas probióticas*. CTC Alim. 24: 24-27.
- Richardson-Harman, N. J., Stevens, R., Walker, S., Gamble, J., Miller, M., Wong, M., y McPherson, A. (2000). *Mapping consumer perceptions of creaminess and liking for liquid dairy products* Food Qual. Pref. 11: 239-246.
- Roberfroid, M. B. (2000). *Prebiotics and probiotics: are they functional foods?*. Am. J. Clin. Nutr. 71 (suppl):1682S-1687S.
- Rodríguez Rivera, V. M. y Magro, E. S. (2008). *Bases de la alimentación humana*. [En línea] http://books.google.com.ar/books?id=c_f5eJ77PnwC&pg=PA58&dq=Astiasaran
- Rojas Castro, W. N., Chacón Villalobos, A. y Pineda Castro, M. L. (2007). *Características del yogurt batido de fresa derivadas de diferentes proporciones de leche de vaca y cabra*. Agronomía Mesoamericana. 18(2): 221-237.
- Roller, S. y Jones, S. (1996). *Handbook of fat replacers*. CRC Press LLC. USA.
- Roman, V. (2013). *Bajaron sólo 6% las muertes por enfermedades del corazón*. Artículo publicado en edición impresa del diario Clarín. [En línea] http://www.clarin.com/salud/Bajaron-solo-muertes-enfermedades-corazon_0_8681131
- Rosenthal A. J. (2001). *Relación entre medidas instrumentales y sensoriales de la textura de alimentos*. En *Textura de los alimentos: Medida y percepción*. Zaragoza, España. Ed. Acribia. 1-17.
- Rothman, B.; y Riqué, T. (1959). *Las gomas galactomananos y la goma de espina corona en la elaboración de productos alimenticios*. Rev. Soc. Quím. Méx. 3(3): 175-176.
- Roupas, P. (2008). *Predictive modelling of dairy manufacturing processes*. Review. Int. Dairy J. 18: 741– 753.
- Rozycki, S. (2003). *Cinética de pardeamiento en sistemas lácteos concentrados: análisis comparativo de modelos*. Ciencia Tec. Alim. 4(2): 95-102.
- Rozycki, S. D. y Seguro, E. F. (1995). *Yogur: cuantificación e influencia de los parámetros reológicos*. Rev. Arg. Lactología. 11: 40-57.
- Rozycki, S., Pauletti, M., Costa, S., Piagentini, A. y Buera, M. P. (2007). *The kinetics of colour and fluorescent development in concentrated milk systems*. Int. Dairy J. 17: 907-915.
- Saavedra, J. M.; Bauman, N. A.; Oung, Y.; Perman, J. A. y Yolken, R. H. (1994). *Feeding Bifidobacterium bifidum and Streptococcus thermophilus to infant in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus*. Lancet. 344: 1046-1049.

- Sady, M; Domagala, J; Najgebauer-Lejko, D. y Grega, T. (2009). *Effect of whey protein concéntrate addition on texture and rheological properties of kéfir produced from skimmed milk*. *Biotechnology in Animal Husbandry*. 25 (5-6): 763-771.
- Santini, C.; Baffoni, L.; Gaggia, F.; Granata, M.; Gasbarri, R.; Di Gioia, D.; Biavati, B. (2010). *Characterization of probiotic strains: an application as feed additives in poultry against Campylobacter jejuni*. *Int. J. Food. Microbiol.* 141: S98-S108.
- Santini, Z. G.; Alsina, D. A.; Athaus, R.; Meinardi, C.; Freyre, M.; Díaz, J. R. y González, C. (2007). *Evaluación de la textura en quesos de oveja. Aplicaciones del análisis factorial discriminante*. *Rev. FAVE – Cs. Agrarias* 5 / 6 (1-2): 7-14.
- Sanz, Y.; Collado, M. C. y Dalmau, J. (2003). *Probióticos: criterios de calidad y orientaciones para el consumo*. *Acta Pediatr. Esp.*, 61(9), 476-482.
- Scardovi, V. (1986). *Genus Bifidobacterium*. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. William and Wilkins, MD, Baltimore. 1418-1434.
- Schaller, A. (2011). *Yogur y leche cultivada - Perfiles productivos*. [En línea] http://www.portalechero.com/ver_items_descrip.asp?wVarItem=2470 [Consultado: enero, 2011].
- Serra, M.; Trujillo, A.J.; Guamis, B.; Ferragut, V. (2009). *Evaluation of physical properties during storage of set and stirred yogurts made from ultra-high pressure homogenization-treated milk*. *Food Hydrocolloids*. 23: 82-91.
- Shah, N. P. (2000). *Probiotic bacteria: Selective enumeration and survival in dairy foods*. *J. Dairy Sci.* 83, 894-907.
- Sharma, S. K.; Mulvaney, S. J. y Rizvi, S. H. (2003). *Ingeniería de los alimentos: Operaciones unitarias y prácticas de laboratorio*. (1ª ed.). México: Limusa Wiley (Ed.).
- Shida, K. y Nanno, M. (2008). *Probiotics and immunology: separating the wheat from the chaff*. *Trends Inm.* 29: 565-573.
- Shim, S. Y.; Anh, J. y Kwak, H. S. (2003). *Functional properties of cholesterol removed whipping cream treated by β -cyclodextrin*. *J. Dairy Sci.*, 86(9), 2767-2772.
- Silveira-Rodríguez, M.B.; Moreno-Megías, S. y Molina-Baena, B. (2003). *Alimentos funcionales y nutrición óptima, ¿cerca o lejos?*. *Rev. Esp. Salud Pública*. 77: 317-331.
- Singh, G. y Muthukumarappan, K. (2007). *Influence of calcium fortification on sensory, physical and rheological characteristics of fruit yogurt*. *Food Science and Technology* 41: 1145-1152.

- Singh, G.; Arora, S.; Sharma, G.S.; Sindhu, J. S.; Kansal, V. K. y Sangwan, R. B. (2007). *Heat stability and calcium bioavailability of calcium-fortified milk*. LWT – Food Sci. Technol. 40 (4): 625-631.
- Siniawski, D. A.; Masson, W.; Sorroche, P.; Casañas, L.; Krauss, J. y Cagide, A. (2011). *Correlación entre las razones apolipoproteínaB/apolipoproteínaA1 y colesterol total/colesterol-HDL en una población saludable: ¿debería actualizarse el índice de Castelli?*. Rev. Argent. Cardiol. 79(1): 33-38.
- Skoog D. A. y Leary J. J. (1988). *Principles of instrumental analysis*. Saunders College Publication. Philadelphia, PA.
- Smewing, J. (2001). *Hidrocoloides*. En *Textura de los alimentos: Medida y percepción* A. J. Rosenthal. Ed. Acribia. Zaragoza, España. 273-291.
- Soldano, N. (2009). *Influencia de variables tecnológicas sobre la acidificación y las características reológicas de yogur*. Tesina de grado Licenciatura en Biotecnología. Universidad Nacional del Litoral. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Santa Fe, Argentina.
- Spitsberg, V.L. (2005). *Bovine milk fat globule membrane as a potential nutraceutical*. J. Dairy Sci. 88: 2289-2294.
- Spotti, M. J., Santiago, L. G., Rubiolo, A. C. y Carrara, C. (2012). *Mechanical and microstructural properties of milk whey protein/espina corona gum mixed gels*. LWT – Food Sci. Tech. 48: 69-74.
- Spreer, E. (1991). *Lactología industrial*. Ed. Acribia. (2ª ed. Zaragoza, España.
- Stanton, C.; Desmond, C.; Coakley, M.; Collins, J.K.; Fitzgerald, G. y Ross, R.P. (2003). *Challenges facing development of probiotic containing functional foods*. En *Handbook of Fermented Functional Foods*. Ed. E.R. Farnworth, 27-58.
- Supavitpatana, P.; Wirjantoro, T.I.; Apichartsrangkoon, A. y Raviyan, P. (2007). *Addition of gelatin enhanced gelation of corn-milk yogurt*. Food Chem. 106: 211-216.
- Szczesniak, A. (2002). *Texture is a sensory property*. Food Qual. Pref. 13: 215-225.
- Szejtli, J. (2004). *Past, present, and future of cyclodextrin research*. Pure Appl. Chem. 76(10): 1825-1845.
- Tamime, A. Y. y Robinson, R. K. (1991). *Yogur, ciencia y tecnología*. Ed. Acribia, Zaragoza. España.
- Tamime, A.Y. (2002). *Fermented milks: a historical food with modern applications - a review*. Eur. J. Clin. Nutr. 56(4): S2-S15.

- Tamime, A.Y. (2009). *Dairy fats and related products*. Society of dairy technology. U.K. [En línea] http://books.google.com.ar/books?id=EXe_KJ5k5BQC&pg=PA26&dq
- Tannock, G. W. (1999). *Identification of Lactobacilli and Bifidobacteria*. Current Issues Molec. Biol. 1(1): 53-64.
- Taranto, M. P.; Médici, M. y Font de Valdez, G. (2005). *Alimentos funcionales probióticos*. Revista Química Viva, 1 (4). <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/v4n1/alimprob.pdf> [Consultado: enero, 2011].
- Tharmaraj N. and Shah N. (2003). *Selective Enumeration of Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus, Streptococcus thermophilus, Lactobacillus acidophilus, Bifidobacteria, Lactobacillus casei, Lactobacillus rhamnosus, and Propionibacteria*. J. Dairy Sci. 86:2288-2296.
- Tomaschunas, M.; Hinrichs, J.; Kohn, E. y Busch-Stockfisch, M. (2012). *Effects of casein-to-whey protein ratio, fat and protein content on sensory properties of stirred yoghurt*. Int. Dairy J. 26: 31-35.
- Toro Vergara, C. A. (2006). *Efecto de la adición de 6-O-Miristil Sacarosa sobre la bicapa de liposomas de POPC y vesículas de DODAC*. Tesis Lic. Química. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Chile.
- Torres Llanez, M.; Vallejo Córdoba, B. y González Córdoba, A. (2005). *Péptidos bioactivos derivados de las proteínas de la leche*. ALAN 55 (2), 111-117.
- Torresani, M. y Somoza, M. (2007). *Lineamientos para el cuidado nutricional*. 2ª ed. Eudeba. Buenos Aires, Argentina.
- Trujillo-de Santiago G., Saenz-Collins, C. P., y Rojas-de Gante, C. (2012). *Elaboration of probiotic oblea from whey fermented using Lactobacillus acidophilus or Bifidobacterium infantis*. J. Dairy Sci. 95: 6897-6904.
- Tuohy, K.M.; Kolida, S.; Lustenberger, A.M. y Gibson, G. R. (2001). *Prebiotic effects of biscuits containing partially hydrolysed guar gum and fructo-oligosaccharides – a human volunteer study*. Br. J. Nutr. 86: 341-348.
- Uprit, S. y Mishra, N. H. (2004). *Instrumental texture profile analysis of soy fortified pressed chilled acid coagulated curd (Paneer)*. Int. J. Food Prop. 7: 367-378.
- Van Vliet, T. (2002). *On the relation between texture perception and fundamental mechanical parameters for liquids and time dependent solids*. Food Qual. Pref. 13(4): 227-236.
- Vanderghem, C. y col. (2008). *Proteome analysis of the bovine milk fat globule: enhancement of membrane purification*. Int. Dairy J. 18: 885-893.

- Vanegas Pérez, L. E. (2009). *Evaluación del efecto del uso de hidrocoloides en la reología de un complemento nutricional líquido*. Tesis Magíster en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Colombia.
- Vercet, A.; Oria, R.; Marquina, P.; Crelier, S. y Lopez-Buesa, P. (2002). *Rheological properties of yoghurt made with milk submitted to manothermosonication*. J. Agric. Food Chem. 50: 6165-6171.
- Vinderola, C. G.; Mocchiutti, P. y Reinheimer, J. A. (2002). *Interactions among lactic acid starter and probiotic bacteria used for fermented dairy products*. J. Dairy Sci. 85(4), 721-9.
- Vinderola, G.; Binetti, A.; Burns, P. y Reinheimer, J. (2011). *Cell viability and functionality of probiotic bacteria in dairy products*. Frontiers Microbiol. 2: 70.
- Vinderola, G.; González de los Reyes-Gavilán, C. y Reinheimer, J. (2010). *Probiotics and prebiotics in fermented dairy products*. En *Innovation in Food Engineering: new techniques and products*. Ed. Taylor and Francis Group. 601-623.
- Vioque, J.; Sánchez Vioque, R.; Clemente, A.; Pedroche, J; Yust, M. M. y Millán, F. (2000). *Péptidos bioactivos en proteínas de reserva*. Grasas y aceites. 51 (5): 361-365.
- Walstra, P. y Jenness, R. (1987). *Química y física lactológica*. Ed. Acribia, Zaragoza. España.
- Watts, B. M. (1992). *Métodos sensoriales básicos para la evaluación de alimentos*. Canadá: International Development Centre (Ed.). [En línea] <<http://idl-bnc.idrc.ca/dspace/bitstream/10625/12666/1/89276.pdf>> [Consultado: enero-2011].
- Williams, P.A. y Phillips, G.O. (2000). *Introduction to food hydrocolloids*. En *Handbook of hydrocolloids*.
- Wood, F. W. (1968). *Psychophysical studies on the consistency of liquid foods*. In *Rheology and Texture of Foodstuffs*, SCI Monograph No. 27. Society of Chemical Industry, London, UK.
- www.drcreate.com/raw-milk-why-mess-with-udder-perfection
- www.naturegum.com
- Yamamoto, S.; Kurihara, H.; Mutoh, T.; Xing, X. y Uhno, H. (2004). *Cholesterol recovery from inclusion complex of β -cyclodextrin and cholesterol by aeration at elevated temperatures*. Bioch. Eng. J. 22(3): 197-205.

Zúñiga Hernandez, L. A.; Ciro Velázquez, H. J. y Osorio Saraz, J. A. (2007). *Estudio de la dureza del queso Edam por medio de análisis de perfil de textura y penetrometría por esfera*. Rev. Fac. Nal. Agr. Medellin. 60 (1): 3797-3811.

Anexos

ANEXO I.

COMPOSICIÓN CENTESIMAL DE MATERIAS PRIMAS Y ADITIVOS.

- Valores teóricos y prácticos para Leche en polvo entera (LPE) (Milkaut):

	Valor teórico	Valor práctico
Humedad	3,5 %	3,71 ± 0,27 %
Cenizas	5,5 %	5,55 ± 0,09 %
Proteínas totales	24,5 %	23,99 ± 0,32 %
Lactosa	45 %	ND
Grasa	26 %	25,87 ± 0,00 %
Calcio teórico	900 mg %	ND

ND: no determinado

- Valores teóricos y prácticos para Leche en polvo descremada (LPD) (Milkaut):

	Valor teórico	Valor práctico
Humedad	3,5 %	3,65 ± 0,02 %
Cenizas	7-8 %	7,76 ± 0,45 %
Proteínas totales	36 %	35,18 ± 0,29 %
Lactosa	50 %	ND
Grasa	máximo 1,5 %	1,43 ± 0,00 %
Calcio teórico	1240 -1250 mg %	ND

ND: no determinado

- Valores teóricos y prácticos para Concentrado de Proteínas de Suero al 35% (WPC35) (Milkaut):

	Valor teórico	Valor práctico
Humedad	3,5-3,7 %	3,78 ± 0,04 %
Cenizas	6,9-7,8 %	6,99 ± 0,13 %
Proteínas totales	35-36 %	35,76 ± 0,18 %
Lactosa	48-51 %	ND
Grasa	3,5-4,5 %	3,89 ± 0,00 %
Calcio teórico	1100 mg %	ND

ND: no determinado

BALANCES DE MASAS PARA LAS FORMULACIONES DEL CASO DE ESTUDIO 1.

- Sólidos totales.

$ST_{teórico} = ST_{LPE} + ST_{WPC} + \%Sacarosa + (\%G + \%AMM + \%GEC + \%Cloruro\ de\ calcio + \%Sorbato\ de\ potasio$

$ST_{teórico} = 13\% + 3\% + 10\% + 1,85\% + 0,025\% + 0,025\% = 27,9\%$ (en nivel máximo de G y AMM, intermedio GEC)

$ST_{teórico} = 13\% + 3\% + 10\% + 0,25\% + 0,025\% + 0,025\% = 26,75\%$ (sin G ni AMM, intermedio GEC)

- Proteína total*

$$\%PT = (\%LPE * \%PT_{LPE} + \%WPC * \%PT_{WPC})/100$$

$$\%PT = (13 * 24.50 + 3 * 35.50)/100 = 4,25\% \text{ (valor mínimo)}$$

- Grasa total*

$$\%GT = (\%LPE * \%GT_{LPE} + \%WPC * \%GT_{WPC})/100$$

$$\%GT = (13 * 26.00 + 3 * 4)/100 = 3,5\%$$

- Cenizas*

$$\%CE = (\%LPE * \%Ce_{LPE} + \%LPD * \%Ce_{LPD} + \%WPC * \%Ce_{WPC})/100$$

$$\%CE = (13 * 5.5 + 3 * 7.4)/100 = 0,937\% \text{ (valor mínimo)}$$

*Se consideró que la cantidad aportada por los aditivos restantes era prácticamente despreciable.

BALANCES DE MASAS PARA LAS FORMULACIONES DEL CASO DE ESTUDIO 2.

Se mantuvo el porcentaje de: 13% LPE, 0,3% G, 0,5% AMM, 0,5% GEC y se varió LPD/WPC35 (3% total) y calcio.

Los Sólidos totales y Proteína total, los valores teóricos se mantendrán en un rango similar a lo calculado para el caso de estudio 1.

Para el caso de la grasa, las variaciones por el adición de LPD/WPC son casi despreciables, siendo que el rango varía entre 3,43 – 3,49%, comparado con el caso de estudio 1.

El valor teórico de cenizas, se verá aumentado (en poca proporción) por el agregado de calcio (que está en el orden entre 0,009 y 0,09%), comparado con el caso de estudio 1.

- Caseína adicionada y total.

La LPE y LPD tienen en su composición prácticamente el 80% de caseína, por lo tanto aporta el 2,7% de la caseína al producto. El WPC35 no aporta caseína en cantidades significativas. Por lo tanto, la cantidad de caseína adicionada va a depender de la concentración de LPD en la muestra.

Las relaciones de LPD/WPC a utilizar son 10:1, 1:1 y 1:10, siendo el 3% el total de ambos adicionados, por lo tanto las relaciones utilizadas serán: 2,727%/0,273%, 1,5%/1,5%, 0,273%/2,727%, respectivamente.

Se crean los diferentes niveles de caseína a partir de las relaciones másicas LPD/WPC: 10:1; 1:1 y 1:10, con el objetivo de maximizar las diferencias entre niveles, respetando el valor total de sólidos lácteos adicionados.

$$\% \text{ Caseína adicionada} = \% \text{LPD} * \% \text{PT}_{\text{LPD}} * \% \text{Cas}_{\text{PT}}$$

$$\% \text{ Caseína adicionada} = 0,2727 * 0,35 * 0,8 = 0,076\% \text{ (relación 1:10)}$$

$$\% \text{ Caseína adicionada} = 1,5 * 0,35 * 0,8 = 0,4\% \text{ (relación 1:1)}$$

$$\% \text{ Caseína adicionada} = 2,727 * 0,35 * 0,8 = 0,764\% \text{ (relación 10:1)}$$

Los valores teóricos de caseína total (considerando que 2,7% lo aporta la LPE) y los valores variables de LPD adicionada, serán: 2,776%, 3,12%, 3,464%, respectivamente.

- Calcio adicionado y total.

Se adicionó como citrato de calcio (citrato tricálcico), el cual contiene un 21% de Ca.

La dosis diaria recomendada de Ca (DDR), según el CAA, es 1000 mg CAL/día.

Se consideran porciones de leche fermentada: 200 gr aproximadamente.

Un alimento, para considerarse fortificado, debe aportar un mínimo del 20% de la DDR establecida para el nutriente en cuestión, entre su contenido natural y/o adicionado (CAA), es decir que debe tener más de 200 mg Ca/porción.

De las materias primas e insumos utilizados se conoce el aporte de calcio aproximado:

LPD: 1250 mg% Ca; LPE: 900 mg% Ca y WPC 35: 1100 mg% Ca.

Calcio total:

$$[\text{Ca}] \text{ mg\%} = \% \text{ LPE} * [\text{Ca}]_{\text{LPE}} \text{ mg\%} + \% \text{ WPC} * [\text{Ca}]_{\text{WPC}} \text{ mg\%} + \% \text{ LPD} * [\text{Ca}]_{\text{LPD}} \text{ mg\%}.$$

$$[\text{Ca}] \text{ mg\%} = (13 * 900 + 2,727 * 1100 + 0,272 * 1250) / 100 = 150,4 \text{ mg Ca/100 g (relación 1:10)}$$

$$[\text{Ca}] \text{ mg\%} = (13 * 900 + 1,5 * 1100 + 1,5 * 1250) / 100 = 152,25 \text{ mg Ca/100g (relación 1:1)}$$

$$[\text{Ca}] \text{ mg\%} = (13 * 900 + 0,272 * 1100 + 2,727 * 1250) = 154,1 \text{ mg Ca/100g (relación 10:1)}$$

Se tienen aproximadamente 150 mg Ca en 100 g de leche fermentada, es decir que en 200 g (que equivale a la porción) tenemos 300 mg Ca/porción (aportando 1500 ppm de calcio), esto significa que las leches fermentadas ya están fortificadas sin ser adicionadas de calcio extra.

Los niveles de Ca adicionado relacionados a las variables codificadas son: (+1) 910 ppm; (0) 500 ppm y (-1) 90 ppm, para lo cual, los niveles de citrato de calcio adicionados respectivos serán: 4330 ppm, 2380 ppm y 430 ppm, respectivamente.

ANEXO II

PREPARACIÓN DE LOS AGENTES SELECTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO PARA EL CRECIMIENTO DE LACTOBACILOS Y BIFIDOBACTERIAS.

- Mupirocina: 100 mg de Mupirocina se diluyeron en 1 mL de alcohol etílico pro-análisis (EtOH), la mezcla se incubó durante 20 minutos a temperatura menor a 0°C para favorecer la disolución, y luego se esterilizó por filtración (0.22 µm).
- Sales biliares: la solución de sales biliares (Sigma-Aldrich) se preparó al 3% en agua estéril libre de nucleasa, se esterilizó (121°C, 15 min) y se adicionó al 0,15% en MRS atemperado a 45-50°C para evitar su desnaturalización térmica.
- Vancomicina: 1 mg de vancomicina (St. Louis, Mo., USA) se diluyó en 2 mL de agua estéril libre de nucleasa y se esterilizó por filtración (0.22 µm), para adicionarse luego en 1 L de medio de cultivo MRS.
- Composición de medio TPY:

Componentes	g/L
Triptona	10.0
Peptona	5.0
Glucosa	15.0
Extracto de levadura	2.5
K ₂ HPO ₄	1.5
MgCl ₂ .6H ₂ O	0.5
Cisteína-HCl	0.5
Tween 80	0.5
pH	6.5
Soft agar	0.6% m/v
Agar	1,5% m/v

- Composición de medio MRS:

Componentes	g/L
Proteosa peptona	10.0
Extracto de carne bovina	10.0
Extracto de levadura	5
Tween 80	1
Citrato de amonio	2
Acetato de sodio	5
Sulfato de magnesio	0,1
Sulfato de manganeso	0,05
Fosfato dipotásico	2
pH	6.5
Soft agar	0.6% m/v
Agar	1,5% m/v

- Solución TE pH 7.6 (100 mL): Diluir 1 mL de TrisHCl 1 M y 0.2 mL de NaEDTA 0.5 mM a pH 8 en 98.9 mL de agua estéril libre de nucleasa.
- Solución TrisHCl 1M pH 8.5: Disolver 121.14 g de TRIS en 1 mL de agua estéril libre de nucleasa, ajustar pH con HCl.
- Solución buffer para la lisis pH 8.2 (100 mL): Diluir 10 ml de TrisHCl 1 M, 40 ml de NaCl 1 M y 0.4 ml de NaEDTA 0,5 M en 49.6 ml de agua estéril libre de nucleasa.
- Solución de NaCl 1 M: Disolver 58.443 g de NaCl en 1 L de agua estéril libre de nucleasa.

- Preparación del medio líquido TBE 1X: para llevar a cabo la electroforesis, fue necesario preparar (y sumergir) el gel a partir de una solución TBE 1X, preparada a partir de agitar hasta dilución completa de 10.8 gr de Tris base, 4 mL de Na EDTA 0.5 M y 5.5 gr de ácido bórico en 1 L de agua estéril libre de nucleasa.
- Preparación del gel de agarosa: se adicionó agarosa al 2% sobre TBE 1X, se calentó hasta dilución completa y se atemperó a 50°C, se vertió en la cubeta (molde) acondicionada y nivelada, conteniendo los peines adecuados para la formación del gel con los respectivos pocillos. Una vez frío se retiraron los moldes y la cubeta para obtener el gel.
- Preparación del marcador: se incorporó 1 µL de GeneRuler 100 bp DNA Ladder plus y 1 µL de 6x MassRuler loading dye solution por cada 4 µL de agua estéril libre de nucleasa.
- Siembra del gel y separación electroforética: se colocaron 6 µL de marcador en los pocillos extremos del gel ya sumergido en TBE 1X previamente atemperado a 10-15°C, dentro del sistema. Sobre cada muestra de ADN a evaluar se adicionaron 4 µL de 6x MassRuler Loading dye solution, se mezclaron y se colocaron 13 µL en el pocillo correspondiente. Se trabajó con corrientes de entre 150 y 200 volts, según tamaño de gel (40-60 pocillos), en base a 7 volts por cm de largo del gel, completándose las separaciones electroforéticas en aproximadamente 90 min.