



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

Tesis para la obtención del grado académico de

Doctor en Tecnología Química

En el campo de Tecnología de Lácteos

# Aportes para el Logro de una Tecnología Tendiente a Disminuir el Contenido de Lactosa del Yogur y a Otorgarle Nuevas Características Funcionales

Ing. CLAUDIA INÉS VÉNICA

Directores: Dra. María C. Perotti

Ing. Carlos A. Zalazar

Tesis desarrollada en el Instituto de Lactología Industrial (UNL/CONICET)



**I N L A I N**

Santa Fe

- 2014 -

*A Sergio por su apoyo y aliento permanente, por su amor.*

*A mis hijos.*

## *Agradecimientos*

---

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por su aporte a la realización de la presente tesis a través de su programa de becas doctorales.

A la Facultad de Ingeniería Química (FIQ) perteneciente a la Universidad Nacional del Litoral por posibilitar la realización de esta tesis a través del Doctorado en Tecnología Química.

Mi agradecimiento a los miembros del jurado por su interés en la evaluación del presente trabajo.

Un especial agradecimiento a Carlos Zalazar por haberme permitido ser parte del grupo de investigación del INLAIN, por su orientación, por haber compartido su experiencia y sus conocimientos al comienzo de este trabajo.

A mi directora M. Cristina Perotti, quien me formó en la investigación científica y me guió constantemente en la realización de la presente tesis, por los conocimientos brindados, por su enorme paciencia, porque fue muy agradable trabajar juntas.

A Susana Palma, por su inmensa ayuda en los análisis fisicoquímicos, brindándome humildemente todos sus conocimientos y su experiencia. Por las charlas, su aliento y buena onda.

A Susana Bernal por su aporte en las técnicas analíticas.

A Milkaut S. A. por su gran aporte en los insumos empleados, a Sergio Ambrosini por sus valiosas contribuciones técnicas.

A Chr. Hansen y Saporiti S. A. por los insumos brindados, a Emilio Vigliengo por su buena predisposición.

A Sofi y Facu, quienes me ayudaron en las elaboraciones de yogur en la planta piloto.

A Carina Bergamini y Verónica Wolf, por sus valiosos aportes en la realización de este trabajo. Por los buenos momentos compartidos.

A Noe y Gise, quienes colaboraron inmensamente en los análisis de laboratorio.

A Nora Sabbag, Silvia Acosta y su grupo de trabajo, del Instituto Tecnológico de Alimentos, por su apoyo en la realización de los análisis sensoriales.

A mis compañeros Aye y Guille por su aporte en los análisis estadísticos, utilización de herramientas informáticas, sus charlas, sus risas, sus chistes, sus palabras de aliento, sus infaltables mates.

A Silvi y Manki, por hacer más llevadero los días al compartir la sala de becarios.

A todos mis compañeros del INLAIN, porque fue sumamente agradable trabajar en el Instituto, porque me estimularon durante la realización de esta tesis.

Gracias a todos los que de alguna manera estuvieron presentes e hicieron posible este trabajo.

**!!!!Muchas Gracias!!!!**

Claudia

## *Publicaciones*

---

Parte de los resultados de la presente tesis han sido divulgados a través de las siguientes publicaciones:

### ***Publicaciones en revistas internacionales***

- Intolerancia a la lactosa. Productos lácteos modificados. (2011). Vénica, C. I.; Perotti, M. C.; Wolf, I. V.; Bergamini, C. V.; Zalazar, C. A. *Tecnología Láctea Latinoamericana*, N° 65: 50-56 (ISSN: 0328-4158). Publitec S. A.
- Dairy Products Modified in Their Lactose Content. (2012). Perotti, M. C.; Wolf, I. V.; Vénica, C. I.; Bergamini, C. V. *Current Nutrition and Food Science* 8 (1): 8-18. Bentham Science Publishers.
- Effect of lactose hydrolysis during manufacture and storage of drinkable yogurt. (2013). Vénica, C. I.; Bergamini, C. V.; Zalazar, C. A.; Perotti, M. C. *Journal of Food and Nutritional Disorders*. (ISSN: 2324-9323). SciTechnol (en prensa).
- Evaluation of the organic acids profiles during manufacture and storage of delactozed yogurt. Vénica, C. I.; Perotti, M. C.; Bergamini, C. V. *Dairy Science and Technology*. Enviado para su evaluación (diciembre, 2013).

### ***Publicaciones de trabajos a congresos nacionales e internacionales***

- XVII Jornadas de Jóvenes Investigadores de la AUGM. Entre Ríos, 27 – 29 de octubre de 2009. *Implementación de una metodología enzimática colorimétrica para la determinación de lactosa en productos lácteos deslactosados*. Vénica, C. I.
- XIII Encuentro de Jóvenes Investigadores de la Universidad Nacional del Litoral y IV Encuentro de Jóvenes Investigadores de Universidades de Santa Fe. Santa Fe, 19 y 20 de noviembre de 2009. *Producción de yogur con contenido reducido de lactosa*. Vénica, C. I.
- XXVIII Congreso Argentino de Química y 4° Workshop de Química Medicinal. Buenos Aires, 13 – 16 de septiembre de 2010. *Implementación de una técnica enzimática-colorimétrica para la cuantificación de lactosa en yogur deslactosado*”. Perotti, M. C.; Vénica, C. I.; Zalazar, C. A.; Bernal, S.

- XIII Congreso de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Buenos Aires, 19 – 21 de octubre de 2011. *Desarrollo de un yogur de contenido reducido en lactosa*. Vénica, C. I.; Palma, S. B.; Cuffia, F.; Perotti, M. C.; Zalazar, C. A.
- Congreso Latinoamericano de Ingenierías y Ciencias Aplicadas. San Rafael, 28 – 30 de marzo de 2012. *Estudio de variables tecnológicas para la obtención de yogur reducido en lactosa*. Vénica, C. I.; Bergamini, C. V.; Wolf, I. V.; Zalazar, C. A.; Perotti, M. C.
- II Simposio Argentino de Lactología. Santa Fe, 16 y 17 de agosto de 2012. *Variables que afectan el proceso de hidrólisis de la lactosa con  $\beta$ -galactosidasa durante la elaboración y vida útil del yogur*. Vénica, C. I.; Bernal, S.; Perotti, M. C.; Zalazar, C. A. *Hidrólisis de la lactosa con  $\beta$ -galactosidasa en la elaboración de yogur con presencia de polvos lácteos*. Vénica, C. I.; Ambrosini, S., Palma, S. B.; Zalazar, C. A.; Perotti, M. C. *Perfiles de ácidos orgánicos en yogur: Influencia de la adición de  $\beta$ -galactosidasa*. Vénica, C. I.; Perotti, M. C.; Bergamini, C. V.
- IV Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Córdoba, 14 – 16 de noviembre de 2012. *Elaboración de yogur deslactosado con probióticos y prebióticos*. Vénica, C. I.; Bergamini C. V.; Vélez, M. A.; Perotti, M. C. *Compuestos bioactivos en yogur: Incremento de galacto-oligosacáridos por acción de una enzima exógena*. Vénica, C. I.; Ingignoli, M. S.; Vélez, M. A.; Bergamini, C. V.; Perotti, M. C.
- XIV Congreso de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Rosario, 23 – 25 de octubre de 2013. *Yogur funcional y reducido en lactosa: características fisicoquímicas y sensoriales*. Vénica, C. I.; Acosta, S. C.; Sabbag, N. G.; Perotti, M. C. *Formación de galacto-oligosacáridos durante la elaboración de yogur por acción de la enzima  $\beta$ -galactosidasa*. Ingignoli, M. S.; Vénica, C. I.; Bergamini, C. V.; Perotti, M. C.
- IV Simposio Internacional de Bacterias Lácticas (SIBAL) Alimentos, Salud y Aplicaciones. San Miguel de Tucumán, 16 – 18 de octubre de 2013. *Comparative study of the volatile profiles of traditional and delactozed yogurts*. Wolf, I. V.; Lazzarino, G.; Vénica, C. I.; Perotti, M. C.

## Índice de Contenidos

---

### INTRODUCCIÓN

1.	Producción de leche y de yogur en Argentina.....	1
2.	Yogur: definición, características y propiedades nutritivas y funcionales.....	3
3.	Variedades de yogur: clasificación.....	5
4.	Proceso tradicional de elaboración de yogur.....	7
5.	Lactosa: definición e intolerancia.....	9
6.	Tratamientos para eliminar o reducir los síntomas de intolerancia a la lactosa.....	12
7.	Estrategias tecnológicas aplicadas en la obtención de productos con contenido de lactosa modificado.....	13
7.1.	Proceso de hidrólisis enzimática.....	14
7.2.	Proceso de ultrafiltración.....	18
7.3.	Proceso cromatográfico.....	18
8.	Yogur reducido en lactosa obtenido por vía enzimática.....	19

### OBJETIVOS

Objetivo general.....	22
Objetivos específicos.....	22

### CAPÍTULO I: Experiencias Preliminares de Hidrólisis / Fermentación

I.1	Introducción.....	23
I.2	Experiencias a escala miniatura.....	24
I.2.1	Materiales y métodos.....	24
I.2.1.1	Diseño experimental.....	24
I.2.1.2	Ensayos realizados.....	25
I.2.1.3	Determinación de lactosa por método enzimático-colorimétrico.....	26
I.2.1.4	Análisis estadístico.....	29
I.2.2	Resultados y Discusión.....	30
I.2.2.1	Efecto del pH.....	30
I.2.2.2	Efecto del momento de adición de la enzima.....	31

I.2.2.3	Efecto de la dosis de enzima en presencia y ausencia del starter .....	32
I.3	Experiencias a mayor escala .....	34
I.3.1	Materiales y métodos .....	34
I.3.1.1	Diseño experimental .....	34
I.3.1.2	Elaboración de yogur .....	34
I.3.1.3	Determinaciones analíticas .....	35
✓	Preparación de la muestra para análisis .....	35
✓	pH .....	35
✓	Acidez titulable .....	35
✓	Lactosa por método enzimático-colorimétrico .....	36
✓	Análisis Estadístico .....	36
I.3.2	Resultados .....	37
I.3.2.1	Porcentajes de hidrólisis de lactosa .....	37
I.3.2.2	Evolución de pH y acidez titulable .....	38
I.3.3	Discusión .....	39
I.4	Conclusiones .....	41

## CAPÍTULO II: Ensayos de Hidrólisis de Lactosa en Modelos de Diferentes Variedades de Yogur a Escala Laboratorio

II.1	Introducción .....	42
II.2	Materiales y métodos .....	43
II.2.1	Diseño experimental .....	43
II.2.2	Elaboración de yogur .....	44
II.2.3	Determinaciones analíticas .....	45
✓	Sólidos totales .....	46
✓	Materia grasa .....	46
✓	Proteínas totales .....	47
✓	pH y acidez titulable .....	47
✓	Sinéresis .....	47
✓	Perfiles de carbohidratos y de ácidos orgánicos por HPLC .....	48
✓	Análisis Estadístico .....	49
II.3	Resultados .....	49
II.3.1	Composición global y sinéresis .....	49



II.3.2 pH y acidez titulable .....	51
II.3.3 Perfil de carbohidratos .....	55
II.3.4 Perfil de ácidos orgánicos .....	59
II.2 Discusión .....	66
II.3 Conclusiones .....	77

## CAPÍTULO III: Elaboración de Yogures Deslactosados y con Propiedades Funcionales Incrementadas

III.1 Introducción .....	78
III.2 Materiales y métodos .....	80
III.2.1 Diseño experimental .....	80
III.2.2 Elaboración de yogur .....	81
III.2.3 Determinaciones analíticas .....	83
✓ Sólidos totales, materia grasa, proteínas totales y sinéresis .....	83
✓ pH y acidez titulable .....	84
✓ Análisis microbiológicos .....	84
✓ Perfiles de carbohidratos y de ácidos orgánicos .....	84
✓ Análisis Estadístico .....	84
III.3 Resultados .....	85
III.3.1 Composición global, recuentos microbiológicos y sinéresis .....	85
III.3.2 pH y acidez titulable .....	86
III.3.3 Perfil de carbohidratos .....	90
III.3.4 Perfil de ácidos orgánicos .....	94
III.4 Discusión .....	96
III.5 Conclusiones .....	100

## CAPÍTULO IV: Validación a Escala Piloto e Industrial

IV.1 Introducción .....	102
IV.2 Elaboración de yogur a escala piloto .....	104
IV.2.1 Materiales y métodos .....	104
IV.2.1.1 Diseño experimental .....	104
IV.2.1.2 Protocolo de elaboración .....	105

IV.2.1.3 Determinaciones analíticas .....	106
✓ Aislamiento de los compuestos de aroma.....	106
✓ Análisis sensorial.....	108
✓ Análisis estadístico .....	109
IV.2.2 Resultados de los yogures elaborados a escala de 30 L .....	109
IV.2.2.1 Compuestos volátiles.....	114
IV.2.2.2 Análisis sensorial.....	122
IV.2.3 Resultados de los yogures elaborados a escala de 100 L .....	124
IV.3 Elaboración de yogur a escala industrial .....	124
IV.3.1 Materiales y métodos.....	124
IV.3.1.1 Diseño experimental .....	124
IV.3.1.2 Determinaciones analíticas .....	126
IV.3.2 Resultados.....	126
IV.4 Discusión .....	127
IV.5 Conclusiones.....	132
CONCLUSIONES.....	134
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	137

## Índice de Figuras

---

### Introducción

<b>Figura 1:</b> Evolución de la producción nacional de leche. ....	1
<b>Figura 2:</b> Cuencas lecheras pampeanas y extra-pampeana. ....	2
<b>Figura 3:</b> Evolución del consumo nacional de yogur. ....	3
<b>Figura 4:</b> Evolución de la producción nacional de yogur. ....	3
<b>Figura 5:</b> Esquema general de clasificación de yogur. ....	6
<b>Figura 6:</b> Esquema clásico de producción de yogur. ....	9
<b>Figura 7:</b> Distribución global de personas intolerantes a la lactosa. ....	12

### Capítulo I

<b>Figura I. 1:</b> Esquema experimental. ....	25
<b>Figura I. 2:</b> Esquema analítico de la determinación de lactosa por método enzimático-colorimétrico. ....	26
<b>Figura I. 3:</b> Evolución de la hidrólisis de lactosa en leche usando la enzima $\beta$ -galactosidasa soluble. Las experiencias fueron realizadas a $42 \pm 2$ °C/4 h con 0,25 g/L de enzima y variando el pH inicial de la leche. ....	30
<b>Figura I. 4:</b> Evolución de la hidrólisis de lactosa en leche usando la enzima $\beta$ -galactosidasa soluble. Las experiencias fueron realizadas a $42 \pm 2$ °C/4 h con 0,25 g/L de enzima y pH 6,7 y con adición del fermento de yogur. ....	32
<b>Figura I. 5:</b> Evolución de la hidrólisis de lactosa en leche usando la enzima $\beta$ -galactosidasa soluble. Las experiencias fueron realizadas a $42 \pm 2$ °C/4 h y pH 6,7, con diferentes dosis de enzima en presencia y ausencia del fermento de yogur. ....	33
<b>Figura I. 6:</b> Equipamiento utilizado para la elaboración simultánea de 5 yogures diferentes a escala de 5 L. ....	35
<b>Figura I. 7:</b> Porcentajes de hidrólisis de lactosa de los yogures durante la elaboración y el almacenamiento refrigerado (5 °C/28 d). ....	37

### Capítulo II

<b>Figura II. 1:</b> Esquema de elaboración de los distintos yogures. ....	45
<b>Figura II. 2:</b> Evolución del pH de yogures naturales (A) y endulzados (B) con adición de diferentes niveles de enzima y de sólidos lácteos, durante la elaboración y el almacenamiento (5 °C/28 d). ....	51
<b>Figura II. 3:</b> Evolución del pH de yogures naturales (A) y endulzados (B) con adición de diferentes niveles de enzima y de sólidos lácteos durante el almacenamiento (5 °C/28 d). ....	52
<b>Figura II. 4:</b> Postacidificación de yogures naturales (A) y endulzados (B) con adición de diferentes niveles de enzima y de sólidos lácteos. ....	53
<b>Figura II. 5:</b> Acidez titulable (AT) de yogures naturales (A) y endulzados (B) con adición de diferentes niveles de enzima y de sólidos lácteos durante el almacenamiento (5 °C/28d). ....	54
<b>Figura II. 6:</b> Perfiles de carbohidratos de muestras de yogur natural batido (4,4%) hidrolizado (0,25 g/L) durante la elaboración y el almacenamiento (5 °C/28 d). ....	55

<b>Figura II. 7:</b> Perfiles de carbohidratos de diferentes yogures al final de la elaboración.....	55
<b>Figura II. 8:</b> Concentración de lactosa de yogures naturales (A) y endulzados (B) con adición de diferentes niveles de enzima y de sólidos lácteos durante la elaboración y el almacenamiento (5 °C/28 d). .....	56
<b>Figura II. 9:</b> Concentración de glucosa y galactosa en los yogures naturales recién elaborados y con 28 días de almacenamiento (5 °C), con adición de diferentes niveles de enzima y de sólidos lácteos.....	58
<b>Figura II. 10:</b> Perfiles de ácidos orgánicos de diferentes yogures al final de la elaboración.....	59
<b>Figura II. 11:</b> Perfiles de ácidos orgánicos de muestras de yogur natural batido (4,4%) hidrolizado (0,25 g/L) durante la elaboración y el almacenamiento (5 °C).....	60
<b>Figura II. 12:</b> Concentración de ácido láctico de yogures naturales (A) y endulzados (B) durante la elaboración y el almacenamiento (5 °C/28 d). .....	61
<b>Figura II. 13:</b> Postacidificación de los yogures estudiados (28 d) y de bibliografía.....	68
<b>Figura II. 14:</b> Rango de valores de acidez titulable de los yogures estudiados y del establecido por el CAA.....	69
<b>Figura II. 15:</b> Rango de concentración de lactosa de los yogures estudiados, de valores de bibliografía y de los establecidos por el CAA.....	71
<b>Figura II. 16:</b> Proporción relativa de lactosa, glucosa y galactosa en relación al total de carbohidratos en los yogures naturales controles e hidrolizados a los 28 días de almacenamiento (5 °C). .....	74

## Capítulo III

<b>Figura III. 1:</b> Esquema de elaboración de los distintos yogures.....	83
<b>Figura III. 2:</b> Evolución del pH de yogures con aspartamo (A) y con sacarosa (B) con adición de diferentes niveles de enzima, de sólidos lácteos y probiótico/prebiótico durante el almacenamiento (5 °C/28 d). .....	87
<b>Figura III. 3:</b> Postacidificación de yogures con aspartamo (A) y con sacarosa (B) con adición de diferentes niveles de enzima, de sólidos lácteos y probiótico/prebiótico. ....	88
<b>Figura III. 4:</b> Evolución de la acidez titulable de yogures con aspartamo (A) y con sacarosa (B) con adición de diferentes niveles de enzima, de sólidos lácteos y probiótico/prebiótico durante el almacenamiento (5 °C / 28 d).....	89
<b>Figura III. 5:</b> Perfiles de carbohidratos de diferentes yogures batidos con aspartamo a los 7 días de almacenamiento (5 °C).....	90
<b>Figura III. 6:</b> Concentración de lactosa de yogures con aspartamo (A) y con sacarosa (B) durante la elaboración y el almacenamiento (5 °C/21 d). .....	91
<b>Figura III. 7:</b> Concentración de glucosa (A) y galactosa (B) de yogures con aspartamo durante la elaboración y el almacenamiento (5 °C/21 d). .....	92
<b>Figura III. 8:</b> Concentración de ácidos orgánicos en mg/100 g en la leche/mezcla de partida, al final de la elaboración y a los 21 días de almacenamiento de yogures con aspartamo (A, lado izquierdo) y con sacarosa (B, lado derecho).....	95

## Capítulo IV

<b>Figura IV. 1:</b> Equipamiento utilizado para las elaboraciones de yogur a escala piloto de 30 L. ....	105
<b>Figura IV. 2:</b> Equipamiento utilizado para las elaboraciones de yogur a escala piloto de 100 L.....	106

<b>Figura IV. 3:</b> Evolución del pH de yogures durante la elaboración y el almacenamiento (5 °C/28 d). .....	111
<b>Figura IV. 4:</b> Evolución de la acidez titulable de yogures durante la elaboración y el almacenamiento (5 °C/28 d). .....	111
<b>Figura IV. 5:</b> Concentración de lactosa de yogures durante la elaboración y el almacenamiento (5 °C/21 d). .....	112
<b>Figura IV. 6:</b> Concentración de GOS de yogures durante la elaboración y el almacenamiento (5 °C/21 d). .....	113
<b>Figura IV. 7:</b> Composición de la fracción volátil de los yogures durante la elaboración, considerando los diferentes grupos químicos de compuestos.....	114
<b>Figura IV. 8:</b> Evolución de los principales compuestos volátiles en los yogures. Se muestran los valores de áreas (en unidades arbitrarias) de las leches de partida (0), a los 150 min y final de elaboración (F).....	116
<b>Figura IV. 9:</b> Valores de áreas (en unidades arbitrarias) de los principales compuestos volátiles en los yogures al final de la elaboración y 21 días.....	120
<b>Figura IV. 10:</b> Descriptores de textura sensorial.....	122
<b>Figura IV. 11:</b> Descriptores del flavor. ....	123
<b>Figura IV. 12:</b> Grados de gusto positivo. ....	123
<b>Figura IV. 13:</b> Equipamiento utilizado para la elaboración de yogur a escala industrial de 4000 L.....	125
<b>Figura IV. 14:</b> Evolución del pH de yogures durante la elaboración y el almacenamiento (5 °C/35 d). .....	127

## Índice de Tablas

---

### Capítulo I

<b>Tabla I. 1:</b> Diseño experimental.....	24
<b>Tabla I. 2:</b> Diseño experimental.....	34
<b>Tabla I. 3:</b> Rango de valores de pH y acidez titulable de los yogures controles y experimentales durante el almacenamiento (5 °C/28 d).....	38

### Capítulo II

<b>Tabla II. 1:</b> Diseño experimental.....	44
<b>Tabla II. 2:</b> Denominación de los yogures.....	44
<b>Tabla II. 3:</b> Contenido de materia grasa, sólidos totales y proteínas de los yogures batidos naturales y endulzados (valores promedio de los yogures controles y hidrolizados).....	50
<b>Tabla II. 4:</b> Porcentaje de sinéresis en yogures naturales y endulzados a los 28 días de almacenamiento a 5 °C.....	50
<b>Tabla II. 5:</b> Concentración de ácidos orgánicos (mg/100 g) de los yogures naturales y con sacarosa medidos durante la elaboración y almacenamiento refrigerado (5 °C/28 d).....	63

### Capítulo III

<b>Tabla III. 1:</b> Diseño experimental.....	81
<b>Tabla III. 2:</b> Denominación de los yogures.....	81
<b>Tabla III. 3:</b> Valores de composición global de los diferentes yogures.....	85
<b>Tabla III. 4:</b> Concentraciones de GOS (g/100 g) en los yogures hidrolizados con sacarosa.....	93

### Capítulo IV

<b>Tabla IV. 1:</b> Diseño experimental.....	105
<b>Tabla IV. 2:</b> Composición global de los yogures.....	110
<b>Tabla IV. 3:</b> Concentración de ácidos orgánicos (mg/100 g) de los yogures.....	113
<b>Tabla IV. 4:</b> Valores de áreas (en unidades arbitrarias) de los distintos compuestos volátiles identificados durante la fermentación de los yogures control (C) e hidrolizados sin y con probiótico y prebiótico (H y HP, respectivamente). En negrita se han resaltado aquellos compuestos derivados del metabolismo de la lactosa y/o de incidencia en el flavor.....	117
<b>Tabla IV. 5:</b> Valores de áreas (en unidades arbitrarias) de los compuestos volátiles identificados en los yogures a los 21 días de almacenamiento.....	121
<b>Tabla IV. 6:</b> Parámetros medidos de los yogures.....	124

## *Abreviaturas y Símbolos*

---

- a: yogur edulcorado con aspartamo.
- AT: acidez titulable.
- C: yogur control.
- CAA: Código Alimentario Argentino.
- E: yogur experimental (con adición de enzima).
- EPS: exopolisacáridos.
- GI: glucosa inicial.
- GOD: glucosa oxidasa.
- GOS: galacto-oligosacáridos.
- GRAS: generalmente reconocidos como seguros. Acrónimo del inglés (*generally recognize as safe*).
- GT: glucosa total.
- H: yogur hidrolizado.
- HP: yogur hidrolizado con probiótico y prebiótico.
- HPLC: cromatografía líquida de alta resolución. Acrónimo del inglés (*high performance liquid chromatography*).
- I, II: yogur con adición de distintos niveles (2,2 y 4,4 g/100 g, respectivamente) de sólidos lácteos (Capítulo II).
- I: yogur con adición de 4,4 g/100 g de sólidos lácteos (Capítulo III).
- IR: índice de refracción.
- LPD: leche en polvo descremada.
- ONPG: o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido.
- P: yogur con adición del probiótico *L. acidophilus* La-5 y del prebiótico inulina.
- Pe: pectina.
- POD: peroxidasa.
- s: yogur edulcorado con sacarosa.
- UF: ultrafiltración.
- WPC: suero concentrado en polvo. Acrónimo del inglés (*whey protein concentrate*).
- % p/p: porcentaje de peso en peso (gramos/100 gramos).
- % p/v: porcentaje de peso en volumen (gramos/100 mililitros).
- % v/v: porcentaje de volumen en volumen (mililitros/100 mililitros).

## *Resumen*

---

El yogur se obtiene por la interacción simbiótica de dos bacterias lácticas termófilas, *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* que debido a la combinación de sus actividades metabólicas conduce a efectos positivos para la obtención del producto. La leche destinada a la elaboración de yogur puede ser fortificada/estandarizada con diferentes ingredientes lácteos, de manera de obtener yogures de diferente consistencia. Algunos de los ingredientes más utilizados son leche descremada en polvo (LDP) y concentrado de proteína de suero (WPC), que no sólo aportan proteínas sino también lactosa a la leche base, lo que contribuye a incrementar su contenido en el yogur elaborado.

Durante el proceso de fermentación ácido-láctica sólo una parte de la lactosa es utilizada por los microorganismos como recurso energético, por lo que el yogur tiene un contenido de lactosa elevado y variable dependiendo de su formulación, entre 3 y 5 g/100 g. Estos niveles podrían no ser tolerados por las personas que padecen la dificultad para asimilar la lactosa.

La intolerancia a la lactosa es un problema que afecta a gran parte de la población mundial, siendo su incidencia muy elevada en América Latina (mayor al 70%). Se produce cuando se tiene una disminución o ausencia de la enzima  $\beta$ -galactosidasa en las vellosidades intestinales; la lactosa no digerida en el intestino delgado pasa al intestino grueso y allí es fermentada por las bacterias de la flora intestinal produciendo una serie de desórdenes intestinales. Uno de los tratamientos recomendados para aliviar los molestos síntomas que ocasiona, es la ingesta de productos lácteos con menor contenido de lactosa. En particular, yogures reducidos o bajos en lactosa son aún inexistentes en el mercado argentino.

El objetivo de la presente tesis fue identificar estrategias tecnológicas para la elaboración de yogur reducido en lactosa mediante la adición de la enzima  $\beta$ -galactosidasa con propiedades funcionales incrementadas por la incorporación de probiótico y prebiótico, con la finalidad de satisfacer las necesidades de un sector de la población que sufre de intolerancia a este azúcar.

Para ello, las primeras actividades planteadas estuvieron dirigidas a evaluar en ensayos a escala reducida, debido a la rapidez y simplicidad de manipulación, el efecto que producían cambios en el pH inicial de la leche, el momento y la dosis de incorporación de la enzima, sobre el proceso de hidrólisis de lactosa. En esta primera etapa se logró reducir



el contenido de lactosa de la leche por encima del 70% empleando niveles de enzima desde 0,16 hasta 0,40 g/L, sin ser necesario modificar el pH inicial de la leche. Además, fue posible que ambos procesos: hidrólisis con la enzima exógena y fermentación por acción del cultivo starter se llevaran a cabo de manera simultánea. Estas condiciones se tomaron como base para la realización de experiencias de elaboración de yogur a mayor escala.

En una segunda etapa, en elaboraciones de yogur de 5 litros se evaluó la influencia de la modificación de la matriz láctea por la suplementación con diferentes sólidos: LPD, WPC, sacarosa e inulina, la reducción del contenido de materia grasa, y la adición de otros ingredientes/aditivos: pectina, aspartamo y un fermento probiótico *L. acidophilus* La-5, en la actividad de la enzima  $\beta$ -galactosidasa y en la actividad metabólica del cultivo starter. Yogures sin la adición de enzima fueron preparados en paralelo y usados como controles. Análisis de los perfiles de azúcares (lactosa, glucosa, galactosa y galacto-oligosacáridos) y de ácidos orgánicos (láctico, cítrico, acético, butírico, hipúrico y orótico), y algunos parámetros de calidad (acidez, sinéresis, composición global, recuentos microbiológicos) fueron evaluados durante la elaboración y el almacenamiento de los yogures.

Los valores de composición global de los yogures resultaron adecuados para cada tipo de producto elaborado y no hubo diferencias entre los hidrolizados y controles. Los recuentos de bacterias totales fueron superiores a  $10^7$  UFC/g y los del cultivo probiótico mayores a  $10^6$  UFC/g, mientras que los recuentos de hongos y levaduras fueron menores a 50 UFC/g. Estos resultados satisfacen los requerimientos establecidos en la Legislación Argentina (CAA). En cuanto a la sinéresis, tampoco se observaron diferencias entre los productos hidrolizados y controles.

Las modificaciones de la matriz láctea tales como la reducción del contenido de materia grasa de la leche y la incorporación de LPD, WPC e inulina, no afectaron de manera significativa la acción hidrolítica de la enzima exógena empleada ni el desenvolvimiento normal del proceso fermentativo. Asimismo, la incorporación del cultivo probiótico y aspartamo al final del proceso de fermentación, no impidieron la evolución habitual de los yogures durante su etapa de almacenamiento.

La evolución del pH durante la elaboración de los diferentes yogures fue normal, sólo en algunos casos se observó que la adición de  $\beta$ -galactosidasa modificó ligeramente el perfil de acidificación, produciendo una ligera demora en la fermentación. Durante el almacenamiento refrigerado también se observó un comportamiento normal en la evolución de la acidez entre hidrolizados y controles, cumpliendo con los requerimientos

del CAA. En general se evidenció que los productos hidrolizados presentaron menores valores de postacidificación.

Los porcentajes de hidrólisis de lactosa estuvieron en todos los casos por encima de 70% alcanzando niveles de hasta 93%, dependiendo de la cantidad de enzima empleada y del tipo de producto, lo que condujo a cambios importantes en perfil de hidratos de carbono. Las concentraciones residuales de lactosa en los yogures recién elaborados fueron bajas, oscilaron entre 0,5 y 1,5 g/100 g, correspondiendo los menores valores a los yogures deslactosados tipo bebible (sin sólidos lácteos) y los mayores para los productos tipo batido (con adición de sólidos lácteos) debido al mayor contenido de lactosa de partida. Por su parte, los yogures controles presentaron niveles de lactosa entre 3,2 y 5,2 g/100 g, dependiendo del tipo de producto. Los valores de glucosa y galactosa en los yogures hidrolizados al final de la elaboración estuvieron en el rango de 1,4 – 2,3 g/100 g y 1,5 – 2,5 g/100 g, respectivamente; mientras que para los controles la glucosa fue menor a 0,2 g/100 g y la galactosa menor a 0,8 g/100 g.

Durante la elaboración del yogur, se comprobó además, la formación de galacto-oligosacáridos (GOS), compuestos con características prebióticas reconocidas, atribuido a la acción secundaria transgalactosidasa que demostró poseer la enzima  $\beta$ -galactosidasa empleada. Las concentraciones de GOS se mantuvieron en niveles entre 0,3 y 0,7 g/100 g durante la conservación de los productos. La presencia de estos compuestos reforzaría aún más las propiedades funcionales de los yogures obtenidos.

Con respecto a los ácidos orgánicos, la inclusión de la enzima  $\beta$ -galactosidasa influyó sólo en algunos casos en la producción de ácido láctico; los yogures hidrolizados presentaron niveles más bajos en comparación a los controles. Estos resultados se encontraron en concordancia con los valores de acidez y reflejan que los cambios en el perfil de hidratos de carbono no influyen substancialmente en la actividad metabólica del fermento.

En la última etapa de este trabajo se validaron en elaboraciones de yogur a escala piloto (30 y 100 L) e industrial (4000 L) algunos de los hallazgos comprobados a menor escala: adición de enzima  $\beta$ -galactosidasa, de ingredientes de origen lácteo tales como LPD y WPC, y adición del cultivo probiótico *L. acidophilus* La-5 y de inulina. Se evaluó el efecto de la modificación introducida en la tecnología habitual de yogur sobre la formación de compuestos de aroma y el perfil sensorial por un panel entrenado, como así también sobre los parámetros que han sido determinados en los yogures a menor escala. Se analizó finalmente el impacto que el yogur deslactosado produce entre los consumidores.

En general, los yogures presentaron características similares a aquellos obtenidos a escala laboratorio, en cuanto a la evolución de la acidez, de los perfiles de ácidos orgánicos y de carbohidratos, la sinéresis y la composición química.

Los yogures deslactosados también resultaron enriquecidos en GOS, con niveles que se ubicaron entre 0,6 – 0,8 g/100 g. El cultivo probiótico se mantuvo en niveles de  $10^7$  UFC/g, lo que es adecuado para alimentos con adición de probióticos. El contenido de lactosa residual en los yogures deslactosados fue inferior a 1,5 g/100 g, alcanzando valores muy bajos de hasta 0,6 g/100 g dependiendo de la variedad. De acuerdo al Código Alimentario Argentino estos productos se denominarían “yogures reducidos en lactosa”.

Los perfiles de compuestos volátiles evidenciaron algunas diferencias principalmente para los yogures deslactosados con adición del probiótico y prebiótico.

Los yogures deslactosados presentaron sabor a leche, gusto dulce más intenso y menor acidez que el yogur tradicional. No se detectaron diferencias en las características de textura, los productos se caracterizaron por ser muy cremosos y con poca aspereza, aunque con poca consistencia. El ensayo de aceptabilidad indicó que el 80% de los consumidores consultados prefirieron los yogures deslactosados; la mayor aceptabilidad estuvo vinculada a la menor acidez y mayor dulzor por la presencia de altos niveles de glucosa y galactosa. Sin embargo, al disminuir el contenido de sacarosa de la leche de partida para la preparación de los yogures deslactosados se consiguió obtener productos con nivel de dulzura y aceptabilidad equivalentes a los tradicionales.

El hecho que la hidrólisis y fermentación de la lactosa se pudieron efectuar en forma simultánea y de una manera adecuada, resulta de vital relevancia desde el punto de vista industrial, ya que no se modificarían los tiempos de proceso habituales de la elaboración del yogur. Asimismo, el empleo de menor cantidad de sacarosa con el propósito de obtener yogures con similar dulzura que los tradicionales, ayudaría a equilibrar el incremento de costos por el uso de la enzima exógena en comparación a la tecnología convencional.

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis permitieron el cumplimiento del objetivo planteado y sugieren la factibilidad de obtener a escala industrial yogures reducidos en lactosa y con la presencia de bacterias probióticas como así también de compuestos bioactivos. De esta manera, no sólo ampliaría el mercado de productos lácteos reducidos en lactosa destinados principalmente a un sector de la población que sufre de intolerancia a este azúcar, de manera que continúen incorporando a la dieta los importantes nutrientes que el yogur aporta, sino que también poseerían propiedades funcionales incrementadas.

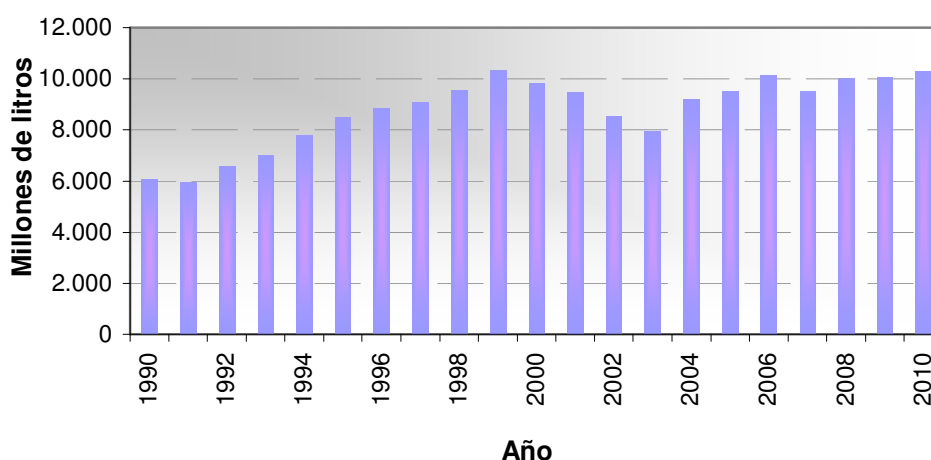
---

# INTRODUCCIÓN

---

## 1. Producción de leche y de yogur en Argentina

La producción de leche ha manifestado históricamente un sostenido crecimiento hasta el año 1999, a partir del cual tuvo una importante caída como consecuencia de la recesión económica, la devaluación de la moneda nacional, la competitividad de los cultivos agrícolas a lo cual se sumaron dificultades climatológicas, especialmente en la primera mitad del 2003 (**Fig. 1**). A partir de 2004, nuevamente comenzó a aumentar la producción hasta llegar a 10307 millones de litros en el año 2010, lo cual ubicó a la Argentina como el 2° país productor de América Latina y 17° en el orden mundial (SAGPyA, 2013).

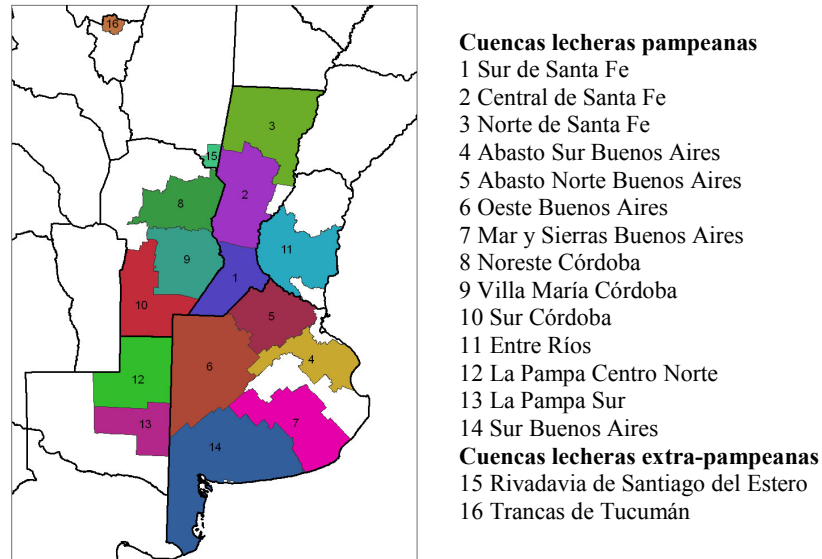


**Figura 1:** Evolución de la producción nacional de leche.

El mercado interno de productos lácteos ha sido muy importante, constituyéndose durante varios años en el principal destino de la leche, tanto en su presentación fluida como en productos elaborados. Sin embargo, en los últimos años las exportaciones han experimentado un crecimiento importante (desde 173951 toneladas en el año 2000 a 317545 toneladas en el 2012), sostenido por la capacidad de producción que supera ampliamente los volúmenes requeridos para satisfacer la demanda interna, situándose nuestro país en uno de los principales países exportadores del mundo (SAGPyA, 2013). En la actualidad, se vende al exterior alrededor del 20% de lo producido (CIL, 2013).

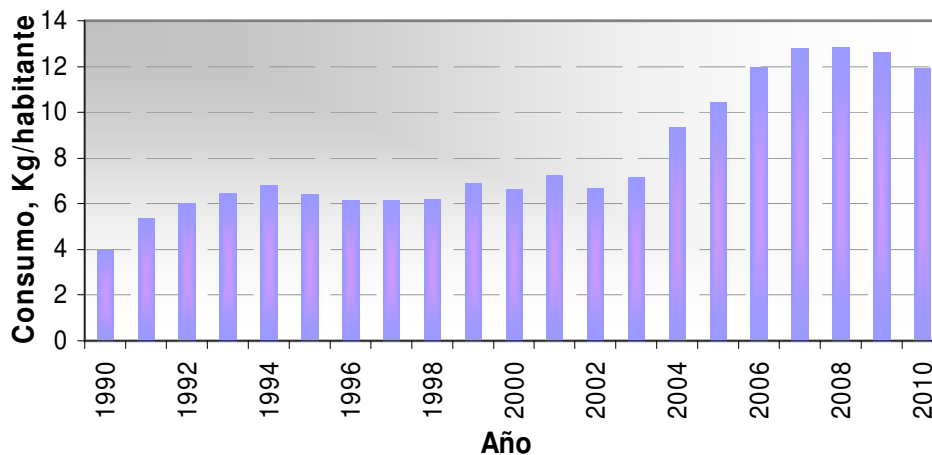
La producción láctea se concentra principalmente en la región pampeana, localizándose en ella las principales “cuencas lecheras” donde se ubica la mayor densidad de tambos. Cinco cuencas (**Fig. 2**) se encuentran ubicadas en la provincia de Buenos Aires (Mar y Sierras, Oeste, Sur, Abasto Sur, Abasto Norte), tres en Santa Fe (Norte, Sur, Central), tres en Córdoba (Sur, Villa María, Noreste), dos en La Pampa (Centro- Norte, Sur) y una en Entre Ríos. Existen además otras zonas productoras de importancia económica a nivel

regional, tales como las Cuencas de Trancas (Tucumán) y Rivadavia (Santiago del Estero), debido a que se ubican cerca de importantes centros urbanos a los que proveen de leche fresca (Sanchez y col., 2012).

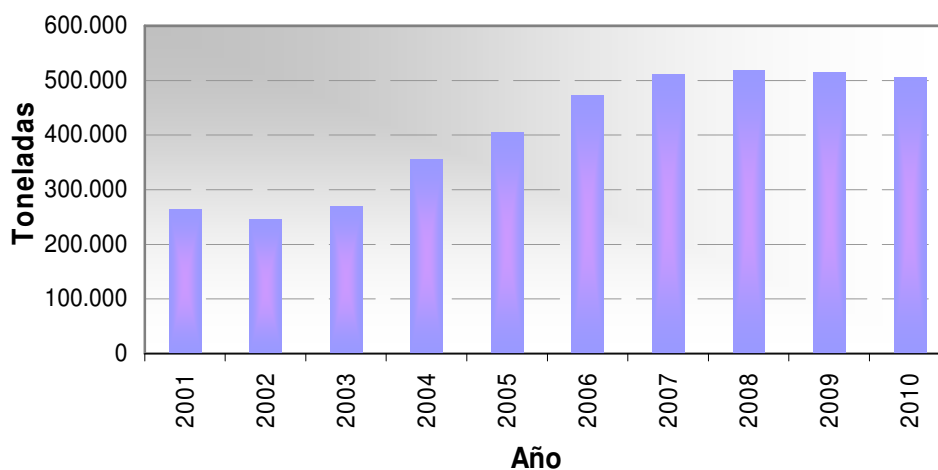


**Figura 2:** Cuencas lecheras pampeanas y extra-pampeana.

El volumen de leche destinado a quesos ocupa el primer lugar, seguido por las leches fluidas y en polvos y yogures. La industria de las leches fermentadas, principalmente yogur, es uno de los sectores más dinámicos ya que desarrolla continuamente productos innovadores para responder a la creciente demanda de los consumidores hacia alimentos naturales, frescos y saludables. Esto se vio reflejado en el consumo, desde el año 1992 hasta el 2004 se mantuvo en niveles estables entre 6 y 7 Kg por habitante por año, luego mostró un continuo incremento hasta duplicarse a 12,8 Kg en 2008 a partir del cual la tendencia se mantuvo (**Fig. 3**). Como consecuencia de este aumento en el consumo, la producción nacional de yogur aumentó en forma paralela desde 264923 toneladas en 2001 hasta 519111 toneladas en 2008, la cual no sufrió cambios importantes hasta 2010 (**Fig. 4**) (SAGPyA, 2013).



**Figura 3:** Evolución del consumo nacional de yogur.



**Figura 4:** Evolución de la producción nacional de yogur.

## 2. Yogur: definición, características y propiedades nutritivas y funcionales

Las leches fermentadas, incluido el yogur, son alimentos muy antiguos, cuyo origen no es preciso. Algunos atribuyen el descubrimiento de yogur a los pueblos que habitaban la región de los Balcanes en la actual Bulgaria. Otros creen que las poblaciones nómades de Asia fueron los primeros en obtener este producto como resultado de conservar la leche en recipientes hechos a partir de pieles de animales. La leche se acidificaba por el desarrollo microbiano y se formaba un coágulo que aumentaba su consistencia a medida que el suero fluía a través de la piel y se evaporaba. De esta manera, se obtenía un producto que mantenía los valiosos nutrientes de la leche y que se conservaba por un tiempo más prolongado (Tamime, 2002; Prajapati, 2008).

El efecto beneficioso de las leches fermentadas data de los trabajos del bacteriólogo ruso Elie Metchnikoff, quien en su libro “La prolongación de la vida” (publicado en 1908)

atribuía el buen estado de salud y longevidad de la población de los Balcanes al consumo regular de grandes cantidades de leches fermentadas (Saxelin y col., 2003; Ibeagha-Awemu y col., 2010). A lo largo de los años, muchos trabajos científicos han confirmado esta teoría. El yogur y leches fermentadas aportan efectos positivos a la salud del ser humano, relacionados al metabolismo del colesterol, sistema inmune, enfermedades intestinales, cáncer de colon, actividad antioxidante, erradicación del *Helicobacter pylori*, enfermedades cardiovasculares y actividad antimutagénica (Tamime, 2002; Prajapati, 2008; Ibeagha-Awemu y col., 2010).

El yogur es un ecosistema simple cuya elaboración exitosa se basa en la acción de dos bacterias lácticas termófilas, *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*. Hay una relación o interacción simbiótica entre estas dos especies (proto-cooperación); el metabolismo combinado tiene efectos positivos sobre el producto fermentado (Angelov y col., 2009). Las bacterias degradan la lactosa produciendo ácido láctico, lo que conduce a cambios profundos en las características estructurales, físicas y sensoriales de la leche (Tamime, 2002; Prajapati, 2008). Una condición indispensable para que este producto lácteo pueda ser definido como yogur según el Código Alimentario Argentino, es que los microorganismos deben estar viables y encontrarse en elevada cantidad ( $> 10^7$  UFC/g) en el producto al momento del consumo (CAAa, 2010).

El yogur es reconocido como una excelente fuente de vitaminas del grupo B, tales como riboflavina (B2), tiamina (B1), ácido fólico (B9) y vitamina B12 (cianocobalamina) (McKinley, 2005), y de minerales como calcio, magnesio, fósforo y zinc (Adolfsson y col., 2004). Las altas concentraciones de minerales encontradas en el yogur sugieren un rol esencial como transportador de nutrientes. La absorción de los minerales no sólo depende del nivel en el cual se encuentren en el alimento sino también de la biodisponibilidad que está relacionada con la solubilidad de la forma química del nutriente (De La Fuente y col., 2003; Delisle y col., 1995). Como es bien conocido, la leche y el yogur contienen cantidades significativas de calcio, el cual se encuentra en un estado biodisponible. En particular, la baja acidez del yogur mejora la biodisponibilidad ya que los minerales están en forma iónica lo que facilita su absorción intestinal (Adolfsson y col., 2004; Singh y Muthukumarappan, 2008).

Contiene proteínas de alto valor biológico y digestibilidad, como resultado de los cambios que ocurren por el tratamiento térmico al cual es sometida la leche/leche base y producción de acidez durante el proceso de elaboración (Adolfsson y col., 2004).



Más recientemente, se ha puesto especial atención en el rol nutricional de ciertos componentes funcionales tales como los galacto-oligosacáridos, que se pueden generar *in situ* en la matriz alimentaria en ciertas condiciones o se pueden agregar como aditivos. Los galacto-oligosacáridos (GOS) son carbohidratos no digeribles, por ser resistentes a las enzimas pancreáticas y salivares, son estables al medio ácido del estómago y las enzimas del intestino delgado no los pueden digerir; sin embargo, son fermentados por la flora beneficiosa del intestino grueso como las bifidobacterias (efecto prebiótico) evitando el desarrollo de la flora indeseable ejerciendo finalmente efectos beneficiosos a la salud (Sako y col., 1999; Kunz y Rudloff, 2006; Gosling y col., 2010; Park y Oh, 2010). Pueden citarse algunos efectos positivos tales como, la reducción de los niveles de colesterol en sangre, la prevención del cáncer de colon y el mejoramiento en la absorción del calcio (Sako y col., 1999; Splechtna y col., 2006). Los GOS están naturalmente presentes en la leche humana y en la leche de vaca, aunque en esta última se han encontrado en menor cantidad (Mussatto y Mancilha, 2007). Está bien documentada la adición de GOS en las fórmulas maternizadas para simular lo más posible la leche humana (Vandenplas, 2002; Playne y Crittenden, 2009).

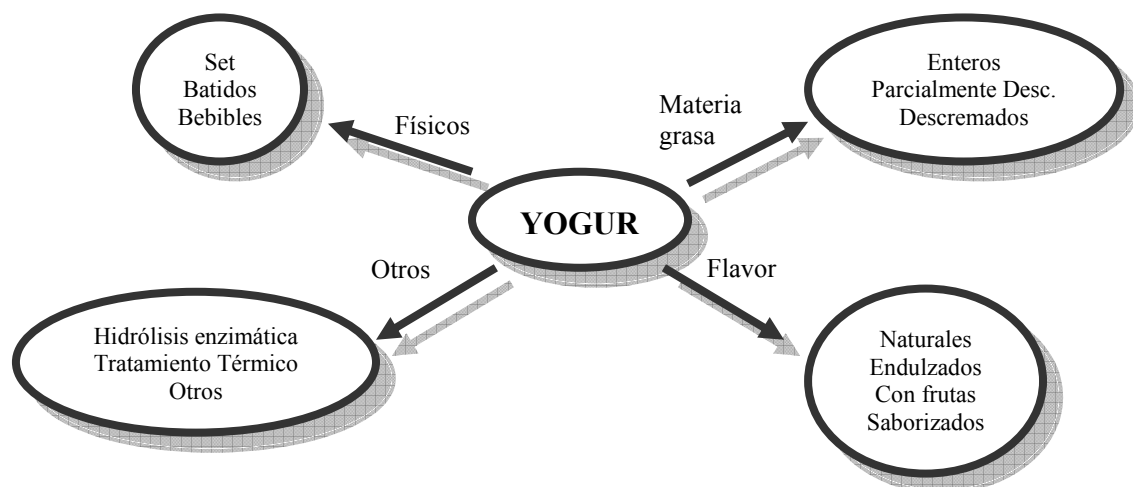
Por otro lado, algunas bibliografías consideran al yogur como un “alimento funcional”, es decir alimentos que cumplen una función beneficiosa en el cuerpo además del valor nutricional básico que se espera del mismo. Otros establecen que para que se lo considere un alimento funcional tiene que tener incorporado microorganismos probióticos o componentes bioactivos (Saxelin y col., 2003, Ibeagha-Awemu y col., 2010; Korhonen, 2010).

### **3. Variedades de yogur: clasificación**

Existe una gran variedad de leches fermentadas en el mercado mundial. Entre ellos, el yogur tiene una gran popularidad y su consumo ha experimentado un notable incremento en los últimos años. Esta tendencia ha motivado que la industria láctea desarrolle nuevas variedades de yogur como los adicionados con cereales y frutas, bajos en grasa o saborizados. También existen en la actualidad yogures en los que se han incorporado bacterias probióticas y sustancias prebióticas, que se suelen denominar yogures simbióticos. Los probióticos son microorganismos vivos que luego de su ingestión ejercen un efecto beneficioso en el huésped (Saxelin y col., 2003). Los prebióticos son sustancias que estimulan selectivamente el crecimiento de la flora intestinal beneficiosa, favorecen la absorción de importantes nutrientes como el calcio, disminuyen los niveles de colesterol

sanguíneo e incluso reducirían el riesgo de cáncer intestinal (Sako y Matsumoto, 1999; Schaafsma, 2008). Un ejemplo de prebiótico es la inulina, que se utiliza como un ingrediente alimentario natural dado que se extrae de varias especies vegetales (ajo, achicoria, cebolla).

Algunos autores han propuesto un esquema para clasificar los diferentes tipos basadas en las características del producto (**Fig. 5**) (Tamime y Robinson, 2007). De acuerdo al estado físico o aspecto del producto dentro del recipiente se pueden obtener yogures líquidos (bebibles) o semi-sólidos (batidos o “stirred”, firmes o “set”); en relación al contenido de materia grasa pueden ser enteros, parcialmente descremados o descremados; en función del agregado de ingredientes tales como sacarosa u otro tipo de flavor pueden ser naturales, endulzados o saborizados; además existen otras variedades como aquellos yogures que están fortificados, los que han sufrido un tratamiento térmico, congelamiento o secado posterior a la fermentación y aquellos que han sido sometidos a un proceso de hidrólisis de lactosa. Es conveniente aclarar que aquel producto al que se le ha aplicado tratamiento térmico no puede rotularse yogur, sino “producto lácteo sin flora láctica activa” (CAAA, 2010).



**Figura 5:** Esquema general de clasificación de yogur.

En la actualidad, el mercado argentino posee una gran variedad de yogures que presentan las características mencionadas: yogures saborizados con frutas de diferentes variedades y frutos secos, endulzados y bajos en grasa y calorías, y con adición de probióticos y prebióticos. Sin embargo, no se encuentran disponibles leches fermentadas y yogur con una concentración reducida en lactosa.

#### **4. Proceso tradicional de elaboración de yogur**

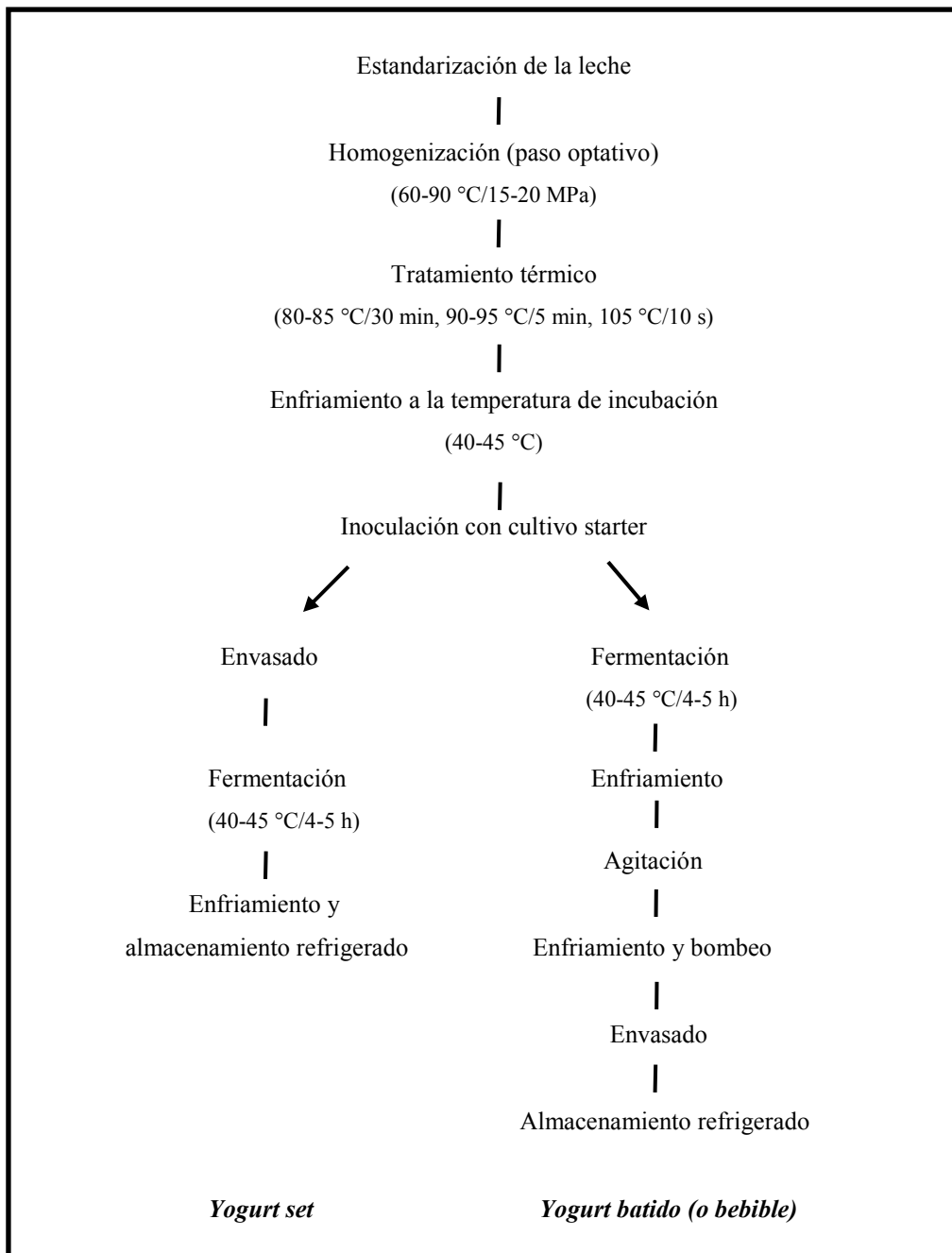
La tecnología de elaboración de los yogures bebibles, batidos y firmes presenta algunas diferencias.

En una primera etapa, se debe normalizar el contenido de grasa y de proteína/sólidos totales de la leche de partida. El contenido de grasa se estandariza hasta el nivel deseado con leche descremada y crema, mientras que el nivel de proteína se puede aumentar mediante la adición de productos lácteos en polvo (leche descremada en polvo, concentrado de proteína de suero, caseinatos, etc) o por procesos de concentración (tecnologías de evaporación bajo vacío o de membranas). En los yogures firmes o batidos se incrementa el contenido de sólidos hasta 15 – 17% de manera de tener un producto final con mayor viscosidad y textura (Tamime, 2002), el yogur bebible es un producto de baja viscosidad por lo que el nivel de fortificación o estandarización de porcentaje de sólidos es inferior al mencionado o incluso no se fortifica.

Los edulcorantes como sacarosa y estabilizantes (almidón, pectinas, gelatina) que contribuyen a la textura se agregan en este momento, en algunos casos según el producto. Se puede aplicar una filtración para eliminar las partículas no disueltas y el aire que se incorporó por la agitación durante el agregado de ingredientes/aditivos y que interfiere con el crecimiento del cultivo starter. A continuación se puede incluir una etapa de homogeneización donde se producen cambios físico-químicos muy ventajosos que contribuyen a lograr una adecuada textura del yogur. Los glóbulos de grasa se rompen en glóbulos más pequeños, su área superficial aumenta y se recubren en parte con caseínas y proteínas del suero (membranas de reposición). Los glóbulos de grasa homogeneizados interactúan mejor con la matriz tridimensional proteica y se favorece la retención del suero, mejorando la consistencia y evitando así la formación de una línea de crema durante la fermentación y almacenamiento. Por el contrario, los glóbulos de grasa nativos producen poros en la matriz por una falta de interacción con las caseínas, favoreciéndose la expulsión de suero (sinéresis). Luego, continúa el tratamiento térmico que es una etapa muy importante en la preparación de yogur, ya que influye en gran medida sobre las propiedades físicas y la microestructura del producto final. Los efectos de este procedimiento son: la destrucción de los microorganismos no deseados y de la mayoría de las enzimas; los cambios en las propiedades físicas y químicas de los constituyentes de la leche, principalmente la desnaturalización de la  $\beta$ -lactoglobulina y su asociación con las caseínas que mejora la firmeza del gel y minimiza la sinéresis; la reducción de los niveles de oxígeno, lo que resulta favorable para el desarrollo del cultivo starter ya que el mismo

es sensible; y la producción de componentes que estimulan el crecimiento del cultivo. Posteriormente, la leche o mezcla base se enfría a aprox. 40 °C y se adiciona el cultivo starter. El proceso fermentativo se lleva a cabo a 40 – 44 °C que es la temperatura óptima para el crecimiento de las bacterias lácticas termófilas. Durante este periodo y como consecuencia de la intensa actividad metabólica se produce la reducción de pH por la producción de ácido láctico a partir de la lactosa, la matriz proteica se desestabiliza y se alcanza la coagulación completa y formación del gel o coágulo a pH 4,7 – 4,8. En este punto, se enfría rápidamente el coágulo para frenar el proceso de fermentación. En el yogur tipo set, la fermentación tiene lugar en los recipientes en los cuales saldrá a la venta y cuando el proceso de fermentación ha cesado los mismos se transfieren a una cámara frigorífica. En el yogur tipo batido o bebible, la fermentación se lleva a cabo en grandes tanques, el enfriamiento hasta 20 – 25 °C se hace en un principio en el mismo tanque acompañado por una suave agitación, luego se envasa y se enfría lentamente hasta que se alcance la temperatura de refrigeración en aprox. 10 h. La consistencia final se consigue durante el almacenamiento a < 10 °C (Tamime, 2002; Van de Water y Naiyanetr, 2008). En el caso de los yogures bebibles, se puede aplicar una etapa de homogeneización luego de la fermentación para lograr una textura más fluida.

En la **Figura 6** se muestran las principales etapas implicadas en la fabricación de yogur.



**Figura 6:** Esquema clásico de producción de yogur.

## 5. Lactosa: definición e intolerancia

La lactosa o denominada comúnmente “azúcar de leche” es un disacárido único en la naturaleza, ya que se halla solamente en la leche de los mamíferos (vaca, cabra, oveja, etc.). Su concentración es variable: la leche humana tiene un elevado contenido de aprox. 7 g/100 mL, mientras que en la leche bovina su nivel es inferior, 4,5 – 5 g/100 mL (Schaafsma, 2008; Fox, 2009).

Desde el punto de vista nutricional, la lactosa es la principal fuente de energía en los primeros años de vida del recién nacido, aportando prácticamente la mitad de la energía requerida (Vesa y col., 2000). Al igual que otros azúcares, actúa como transportador de minerales facilitando la absorción de los mismos, y es fuente de galactosa, nutriente esencial en la formación de galactolípidos cerebrales (Schaafsma, 2008; Mlichová y Rosenberg, 2006).

La absorción de lactosa en el ser humano se realiza por la acción de la enzima  $\beta$ -galactosidasa, localizada en la mucosa del intestino delgado (la mayor actividad enzimática se ubica en el yeyuno y menores niveles en el duodeno e íleon), que la desdobra en sus componentes constituyentes glucosa y galactosa, los cuales luego son absorbidos (Mahoney, 2003; Schaafsma, 2008; Ingram y Swallow, 2009). Esta enzima ya está presente en el feto durante la segunda mitad del embarazo, alcanzando su máxima actividad poco después del nacimiento (Schaafsma, 2003). Posteriormente, es normal que se produzca una disminución progresiva de la enzima, que se puede iniciar en la infancia, adolescencia o en la edad adulta. En algunos casos, puede ocurrir una deficiencia congénita de la enzima, es decir que hay una carencia desde el nacimiento, aunque este hecho no es muy común (Mlichová y Rosenberg, 2006; Ingram y Swallow, 2009; Alm, 2003). La persistencia de la enzima en la mucosa intestinal está genéticamente controlada y varía entre las diferentes razas y grupos étnicos. De hecho, en poblaciones como las nórdicas el nivel y actividad de la enzima en la adultez es similar a la encontrada en la infancia, mientras que en las poblaciones asiáticas y africanas se han evidenciado deficiencias notorias. Asimismo, se han observado variaciones en la persistencia de la enzima entre las diferentes personas; algunos adultos son capaces de digerir grandes cantidades de leche mientras que otros presentan síntomas de malabsorción de lactosa tras la ingesta de pequeñas cantidades. Por otro lado, se puede producir una disminución (reversible) de la enzima por una agresión de la mucosa intestinal provocada por virus, infecciones bacterianas o parasitarias, antibióticos, diarreas infecciosas, enfermedad celíaca, ingesta excesiva de alcohol, etc.

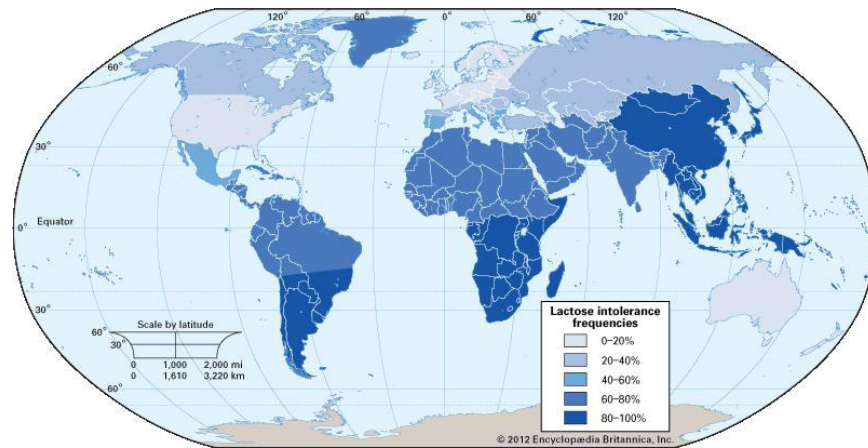
La lactosa que no se hidroliza completamente en el intestino por disminución o ausencia de enzima  $\beta$ -galactosidasa, llega al intestino grueso y allí es fermentada por las bacterias de la flora intestinal produciendo una serie de desórdenes tales como diarreas, distensión abdominal, náuseas, flatulencias, pérdida de apetito, cólicos intestinales, etc. La aparición clínica de uno o más de estos síntomas se conoce como “intolerancia a la lactosa. La cantidad de lactosa que provoca estos síntomas varía de un individuo a otro y depende de

varios factores tales como la cantidad de lactosa ingerida, la sensibilidad del individuo, la velocidad de vaciado gástrico, el tiempo de tránsito gastrointestinal y el tipo de flora del intestino grueso, como así también el/los tipo/s de alimento/s que es/son co-ingerido/s (Vesa y col., 2000; De Vrese y col., 2001; Hertzler y Clancy, 2003; Heyman, 2006). Si bien no es causa de mortalidad, los síntomas mencionados pueden causar importantes malestares, provocando una disminución de la calidad de vida y en el caso de tratarse de niños puede alterar sus actividades escolares, deportivas y recreativas (Heyman, 2006). El término malabsorción de lactosa se refiere al problema fisiológico que se manifiesta como intolerancia a la lactosa y es atribuible a un desbalance entre la cantidad de lactosa ingerida y la capacidad enzimática para hidrolizar la lactosa (Heyman, 2006). Otra consecuencia desfavorable además de la disminución o ausencia en la absorción de lactosa, es la mala absorción de minerales, que en el caso particular del calcio podría ocasionar una descalcificación del esqueleto (Pochart y col., 1989).

De acuerdo a un informe científico reciente emitido por la *European Food Safety Agency* (EFSA, 2010), no se puede determinar una cantidad de lactosa umbral única para todos los sujetos intolerantes debido a la gran variación en las tolerancias individuales. En efecto, en algunos sujetos se han descrito síntomas de intolerancia luego de la ingesta de cantidades inferiores a 6 g de lactosa, aunque la gran mayoría puede tolerar hasta 12 g de lactosa consumida en una sola dosis sin percibir síntomas y se pueden tolerar dosis más altas si se la distribuye a lo largo del día.

Muchas veces la intolerancia a la lactosa se confunde con la alergia a la leche de vaca, ya que los síntomas son a menudo similares, sin embargo ambos problemas no están relacionados. La alergia a la leche de vaca es una reacción hacia las proteínas (principalmente hacia una de las proteínas solubles de la leche, la  $\beta$ -lactoglobulina) provocada por el sistema inmune, a diferencia de la intolerancia a la lactosa que es un problema causado por el sistema digestivo, como ha sido mencionado (Tuure, 2007).

La intolerancia a la lactosa es un problema común en muchas partes del mundo; se estima que alrededor del 70% de la población mundial se ve afectada (**Fig. 7**). En América del Sur, África y Asia la prevalencia es del 50% pudiendo alcanzar un 100% en países como Japón y China. En Estados Unidos, existen aprox. 50 millones de personas con este problema, variando la prevalencia desde un 15% en la población blanca hasta un 80% en la población negra. Solamente hay una escasa incidencia de personas intolerantes en Europa del norte y central, islas británicas, Australia y Nueva Zelanda (Vesa y col., 2000; De Vrese y col., 2001; Saxelin y col., 2003; Messia y col., 2007).



**Figura 7:** Distribución global de personas intolerantes a la lactosa

## 6. Tratamientos para eliminar o reducir los síntomas de intolerancia a la lactosa

El tratamiento para disminuir o eliminar los síntomas producidos por la malabsorción de la lactosa es relativamente simple y consiste en eliminar parcial o totalmente de la dieta aquellos alimentos que contengan lactosa en su composición, tales como leche y productos lácteos, debido a que no existe ningún tratamiento para aumentar la habilidad del organismo para sintetizar la enzima lactasa. Sin embargo, el dejar de consumir leche y sus productos derivados ocasionaría que no se incorporen al organismo los niveles de calcio necesarios y otros nutrientes esenciales que la leche provee (Brand y Holt, 1991), debiéndose proporcionar calcio por otras fuentes dietarias no lácteas o por suplementos alternativos (Heyman, 2006).

Los nuevos enfoques de tratamientos para la intolerancia a la lactosa establecen que no es necesario evitar la leche y los productos derivados (Heyman, 2006). En algunos casos se pueden ingerir pequeñas cantidades de leche junto con otro alimento, sin que se perciban síntomas intensos (Alm, 2003). Por otro lado, existen en el mercado preparaciones farmacéuticas de la enzima  $\beta$ -galactosidasa que se han desarrollado para tratar este problema. Las mismas se presentan en forma de tabletas que se ingieren junto con la leche o pueden ser utilizadas para preparar en el hogar una leche con un menor contenido de lactosa (Vesa y col., 2000; Mlichová y Rosenberg, 2006). En este último caso se adiciona la enzima a la leche y se la deja toda la noche en el refrigerador (Shakeel-Ur-Rehman, 2009). Si bien existen evidencias que este tratamiento provoca una disminución o alivio de los síntomas, las diferentes enzimas disponibles en el mercado parecen variar en su efectividad (Vesa y col., 2000).



La alternativa más efectiva y conveniente para tratar este problema es consumir leche y productos lácteos cuyo contenido de lactosa se ha reducido durante su proceso de obtención, ya que de esta manera se continuaría incorporando a la dieta los importantes nutrientes que aporta la leche (Mlichová y Rosenberg, 2006). En este sentido, la industria láctea ha trabajado incesantemente para brindar productos lácteos en los cuales el contenido de lactosa se ha reducido en diferente grado, antes de su empaque y venta (Mahoney, 2003; Messia y col., 2007; Shakeel-Ur-Rehman, 2009). Estos alimentos especiales están cada vez más al alcance del consumidor en todo el mundo. Los productos más difundidos son las leches fluidas pasteurizadas o esterilizadas (UHT), aunque también se pueden conseguir leches en polvo, y en algunos países cremas, helados y leches fermentadas (Saxelin y col., 2003). Las líneas de productos más populares en los mercados de Europa y Estados Unidos incluyen los siguientes: "Lactaid", "Dairy Ease", "Mootopia", "HYLA®" de Valio Ltd. (Finlandia), "Emmi", "Kaiku" (España) y "Lacto-free" de Arla (Shakeel-Ur-Rehman, 2009). Los primeros productos se lanzaron al mercado hace aprox. 40 años, a partir del cual las ventas se incrementaron lentamente y se espera que continúen haciéndolo (Harju y col., 2012). De acuerdo a un reporte muy actual, se observó un crecimiento notorio en el mercado de alimentos lácteos bajos y reducidos en lactosa en varias regiones del planeta, incluso en países como los europeos donde la tasa de intolerancia a la lactosa es baja. Se piensa que este hecho está impulsado por el aumento de casos de auto-diagnóstico de intolerancia y las mejoras tecnológicas (Melletín, 2012). Por otro lado, el informe de EFSA (2010) establece que el consumo de estos lácteos con lactosa modificada no produciría ninguna consecuencia nutricional negativa, ya que la única diferencia con los alimentos convencionales es la disminución en el contenido de lactosa.

En Argentina, actualmente sólo una empresa láctea fabrica productos con un contenido de lactosa inferior al encontrado naturalmente en la leche, entre ellos leches UHT y en polvo. La composición de hidratos de carbono mencionada en el rótulo es la siguiente: 1 g/100 mL de lactosa, 2 g/100 mL de glucosa, 2 g/100 mL de galactosa, y carbohidratos totales 4,95 g/100 mL.

## **7. Estrategias tecnológicas aplicadas en la obtención de productos con contenido de lactosa modificado**

Varios métodos pueden emplearse para reducir o incluso eliminar en su totalidad la lactosa presente en los productos lácteos, de manera de obtener un alimento aceptable para

las personas que no pueden digerir adecuadamente este azúcar. Uno de los procesos biotecnológicos más difundidos es la hidrólisis enzimática de la lactosa con la enzima  $\beta$ -galactosidasa, en forma soluble o fijada a un soporte. Otras tecnologías empleadas incluyen la separación de la lactosa por métodos físicos como la ultrafiltración y la cromatografía.

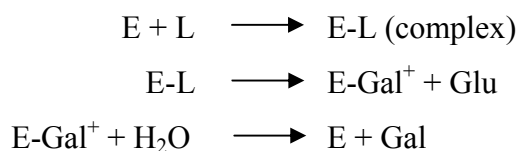
### 7.1. Proceso de hidrólisis enzimática

#### *Aspectos generales de la enzima $\beta$ -galactosidasa*

En la industria alimentaria se ha incrementado la tendencia al diseño e implementación de procesos que incluyen enzimas. Las enzimas son moléculas complejas de naturaleza proteica con función específica, son catalizadores biológicos ya que son las responsables de acelerar reacciones químicas que transcurren naturalmente a muy baja velocidad, tienen la capacidad de operar en condiciones moderadas de pH, temperatura y presión, con alta actividad enzimática y biodegradabilidad. Además, la cantidad de subproductos y los requisitos de energía son relativamente bajos, pero tienen algunas limitaciones para su aplicación a escala comercial, como ser el elevado costo, la baja productividad y la estabilidad, la inhibición por el producto final y los parámetros cinéticos de la reacción. De todas las clases de enzimas aplicadas en el área de los alimentos, las más frecuentemente utilizadas son las hidrolasas (Fernandes, 2010; Repelius, 2001).

Las  $\beta$ -galactosidasas son una familia amplia de enzimas capaces de catalizar la hidrólisis de galactósidos, glicósidos que contienen galactosa, a monosacáridos. Se pueden tener  $\alpha$ - o  $\beta$ -galactósidos, dependiendo del enlace glicosídico entre la galactosa y el resto orgánico. La lactosa es el  $\beta$ -galactósido más común, y es el sustrato específico de las lactasas; en su hidrólisis se forman los monosacáridos glucosa y galactosa. Si bien todas las lactasas son  $\beta$ -galactosidasas, la inversa no es cierto (Dekker y Daamen, 2011).

El mecanismo de acción de las lactasas sobre la lactosa no está completamente dilucidado, pero la reacción se puede describir de la siguiente manera (Mahoney, 2003):



Donde E: enzima lactasa, L: lactosa, E-L: complejo enzima-lactosa, E-Gal<sup>+</sup>: intermediario enzima-galactosa, Gal: galactosa, Glu: glucosa.

El desenlace de la reacción depende de la abundancia relativa de los aceptores de hidroxilo. En general, las glicosidasas pueden transferir el resto glicosídico de un sustrato a aceptores hidroxilo. La hidrólisis representa un caso especial en que el agua actúa como

aceptor de hidroxilo (Playne y Crittenden, 2009). No siempre se llega a una conversión completa de ambos monosacáridos, debido a la inhibición por retroalimentación de la reacción por la galactosa, inhibición competitiva, y por una inhibición no competitiva por parte de la glucosa, así como a las reacciones secundarias simultáneas que producen oligosacáridos (reacción de transgalactosilación) (Mahoney, 2003; Mateo y col., 2004; Playne y Crittenden, 2009). El intermediario enzima-galactosa reacciona con otra molécula de azúcar (por ejemplo lactosa, glucosa o galactosa) en lugar del agua (Mahoney, 2003). Si bien inicialmente los oligosacáridos, compuestos principalmente por galacto-oligosacáridos (GOS), se consideraron subproductos no deseados de la hidrólisis de la lactosa, investigaciones recientes han sugerido que estos compuestos son resistentes a las enzimas digestivas y tienen un efecto beneficioso sobre el intestino humano ya que promueven el crecimiento de las bifidobacterias (factor bifidogénico) (Mahoney, 1998; Mahoney, 2003; Schaafsma, 2008; Playne y Crittenden, 2009; Park y Oh, 2010). Los factores que gobiernan los procesos de hidrólisis y transgalactosilación son la concentración de lactosa de la materia prima, el tipo y nivel de enzima empleada, y las condiciones de reacción tales como pH, temperatura y tiempo de contacto entre la enzima y el sustrato (Shakeel-Ur-Rehman, 2009; Playne y Crittenden, 2009).

Las  $\beta$ -galactosidasas están ampliamente distribuidas en la naturaleza debido a sus múltiples funciones (Richmond, 1981; Mahoney, 2003). Se las encuentra en las plantas: durazno, damasco, almendra (Richmond y col., 1981), naranja (Wu y Burns, 2004), porotos (Sun y col., 1999), tomate (Smith y Gross, 2000) y fresa (Trainotti y col., 2001) y en órganos animales excepto intestino. Por su parte, las lactasas se las encuentra solamente en el tracto intestinal de mamíferos (Playne y Crittenden, 2009) y en microorganismos (Richmond, 1981; Mahoney, 2003; Dekker y Daamen, 2011). En particular, las  $\beta$ -galactosidasas de origen microbiano que incluyen bacterias, hongos y levaduras son las que se prefieren para uso industrial debido al mayor rendimiento en la producción de esta enzima. En los últimos años, el ambiente marino también se ha considerado como una fuente de enzimas tanto de origen microbiano como de organismos superiores (Playne y Crittenden, 2009; Fernandes, 2010; Trincone, 2011). A pesar de que numerosas  $\beta$ -galactosidasas microbianas han sido purificadas y caracterizadas, las que se emplean en la industria láctea son aisladas de un número bastante acotado de microorganismos con el estado de GRAS (generalmente reconocidos como seguros). Las de mayor importancia comercial son las que provienen de levaduras: *Kluyveromyces lactis*, *K. fragilis* y *Candida*

*pseudotropicalis*, de hongos: *Aspergillus niger* y *A. oryzae* y de bacterias: *Streptococcus thermophilus* y *Bacillus subtilis* (Mahoney, 2003; Mlichová y Rosenberg, 2006; Grosová y col., 2008). Las mismas difieren significativamente en sus características tales como especificidad, estructura, peso molecular, secuencia de aminoácidos, posición del sitio activo, pH y temperatura óptima de acción (Mlichová y Rosenberg, 2006; Playne y Crittenden, 2009). En general son enzimas intracelulares en bacterias y levaduras, pero pueden ser intra o extracelulares en los hongos. Las condiciones óptimas de temperatura y pH son factores que determinan el área potencial de aplicación de una enzima en particular. Se las puede subdividir en dos grupos: lactasas neutras y ácidas. Las lactasas provenientes de *Kluyveromyces* poseen un pH óptimo neutro (6,5 a 7,5) y se desnaturalizan a temperaturas superiores a 40 °C, por lo que se las utilizan para hidrolizar la lactosa en la leche a temperatura moderada (30 – 40 °C) (Mahoney, 2003; Mlichová y Rosenberg, 2006; Playne y Crittenden, 2009). Estas condiciones de trabajo tienen la desventaja que pueden promover el crecimiento microbiano y por lo tanto una contaminación. Las lactasas de hongos poseen un pH óptimo ácido, tienen la ventaja de ser estables a alta temperatura y también poseen una actividad elevada a alta temperatura, pudiéndose las utilizar a temperaturas de hasta 50 – 55 °C (Mahoney, 2003; Playne y Crittenden, 2009). En este caso las temperaturas más altas y el medio ácido son eficaces para minimizar el crecimiento microbiano (Mahoney, 2003). Para evitar la contaminación microbiana, cada vez más se utilizan  $\beta$ -galactosidasas termoestables y activas en frío (Playne y Crittenden, 2009; Fernandes, 2010; Panesar y col., 2010; Dekker y Daamen, 2011).

#### *Procedimientos de hidrólisis*

El proceso enzimático puede llevarse a cabo de diferentes maneras. Los procedimientos más populares involucran el uso de  $\beta$ -galactosidasas purificadas en forma libre o en solución, o inmovilizada en un soporte. Hay técnicas más recientes de potencial aplicación para la hidrólisis de lactosa que utilizan cultivos celulares crudos que proporcionan  $\beta$ -galactosidasas sin purificación previa.

En el método que emplea la enzima soluble o libre, la misma se añade directamente a la solución o mezcla de reacción y tiene la desventaja que no puede ser reutilizada. La tecnología de enzima inmovilizada, en la cual la enzima se encuentra físicamente retenida en una matriz o soporte sólido, se ha desarrollado para un mejor control de la reacción y para permitir su reutilización, aunque tiene un costo elevado (Mahoney, 2003; Panesar y

col., 2010; Dekker y Daamen, 2011). Las  $\beta$ -galactosidasas son una de las enzimas más estudiadas en cuanto a su inmovilización; se han analizado varios métodos de inmovilización (adsorción física, entrecruzamiento, unión covalente, para citar algunos) y diferentes tipos de soportes (algodón, alúmina, perlas de vidrio y de celulosa, sílice, entre otros (Grosová y col., 2008; Haider y Husain, 2009; Song y col., 2010). La enzima soluble se utiliza normalmente para procesos discontinuos mientras que la forma inmovilizada tiene la ventaja que se puede utilizar tanto en procesos discontinuos como continuos (Grosová y Rosenberg, 2008; Fernandes, 2010; Panesar y col., 2010).

Como se mencionó anteriormente, la contaminación microbiana es un problema, por lo que es necesario la aplicación de medidas de saneamiento intermitentes en el procesamiento continuo de leche en gran volumen (Repelius, 2001; Playe y Crittenden, 2009).

Finalmente, el método de cultivos celulares es una estrategia conveniente y económica para obtener productos con lactosa hidrolizada, incluso para las pequeñas plantas lecheras (Vasiljevic y Jelen, 2001). Este método involucra el crecimiento de un cultivo de bacterias o levaduras con alta actividad  $\beta$ -galactosidasa, la concentración de la biomasa celular y la disrupción o permeabilización del cultivo concentrado. La disrupción celular, por sonicación (Kreft y col., 2001), molienda con perlas (Vasiljevic y Jelen, 2002) o microfluidización (Vasiljevic y Jelen, 2003), implica la rotura de la envoltura celular y la liberación de todos los componentes intracelulares en el medio circundante. La permeabilización de la célula mediante el uso de diversos compuestos tales como etanol, detergentes y preparaciones de sales biliares, implica la pérdida de la capacidad de la membrana celular para controlar el transporte activo de solutos, y permite por consiguiente el paso pasivo de componentes hacia el exterior celular (Somkuti y col., 1998; Panesar, 2008).

Bury y col. (2001) compararon la liberación de  $\beta$ -galactosidasas de *L. bulgaricus* utilizando los tres métodos de sonicación mencionados; encontraron que la microfluidización y el tratamiento con perlas fueron los más eficientes y se pueden aplicar para obtener leche hidrolizada. Por otro lado, se alcanzaron altos niveles de hidrólisis de la lactosa en leche utilizando una biomasa de bacterias permeabilizadas de *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* y *K. marxianus* (Somkuti y Steinberg, 1995; Somkuti y col., 1996; Somkuti y col., 1998; Panesar, 2008).

## **7.2. Proceso de ultrafiltración**

La ultrafiltración (UF) se refiere a una técnica de separación de membrana que utiliza materiales poliméricos semi-permeables o de cerámica, para separar los diferentes componentes de una mezcla fluida en función del tamaño molecular y las interacciones químicas entre la membrana y los componentes. La principal fuerza impulsora del proceso es la presión aplicada, que varía desde 0,3 hasta 0,8 MPa y las temperaturas de trabajo están en el rango de 25 – 50 °C. El tamaño de poro de las membranas de UF se encuentra entre  $10^{-1}$  –  $10^{-3}$  micras y el peso molecular de corte en el intervalo de 1 – 100 kDaltons.

Este proceso se utiliza para concentrar selectivamente algunos componentes macromoleculares de la leche, como por ejemplo, proteínas (caseínas y proteínas solubles), grasas y vitaminas solubles en grasa, mientras que los minerales, lactosa, nitrógeno no proteico, urea, aminoácidos y vitaminas solubles en agua atraviesan la membrana (Shakeel-Ur-Rehman, 2009; Limsawat y Pruksasri, 2010). Las corrientes obtenidas se denominan retenido o concentrado (partículas más grandes que los poros de la membrana) y permeado o filtrado (partículas más pequeñas que los poros de la membrana). De esta manera el retenido es leche concentrada y resulta adecuada para la producción de queso y yogur (Tossavainen y Kallioinen, 2007a). En particular, la aplicación de UF a yogur tiene la ventaja que el yogur obtenido resulta reducido en lactosa. Algunos trabajos relacionados a este aspecto se discuten a continuación. Kosikowski (1979) preparó yogures bajos en lactosa a partir de diluciones con agua de retentados de leche descremada (20 kDa de corte/50 °C/3,4 kg/cm<sup>2</sup>) para variar el contenido de proteína entre 3,5 – 4,5%. Los yogures obtenidos tuvieron < 0,6% de lactosa y las características sensoriales de firmeza y de viscosidad fueron adecuadas, a pesar del menor contenido en minerales del yogur tradicional (sin aplicación de UF). Más recientemente, Rinaldoni y col. (2005) estudiaron las características físico-químicas, microbiológicas y organolépticas de yogures elaborados a partir de leche concentrada por UF (10 kDa de corte/22 °C/1,5 bar). Se obtuvo una reducción del contenido de lactosa del 50%, los yogures tuvieron características sensoriales comparables al producto tradicional.

## **7.3. Proceso cromatográfico**

En 2001, la empresa láctea finlandesa Valio desarrolló un proceso cromatográfico para eliminar específicamente la lactosa de la leche. A pesar de que el problema de intolerancia a la lactosa es relativamente bajo en Finlandia (cerca del 20% de la población total) teniendo en cuenta el contexto internacional, el problema es significativo debido al elevado

consumo de leche en ese país (aprox. 140 litros por persona al año) (Saxelin y col., 2003; Jelen y Tossavainen, 2003; Shakeel-Ur-Rehman, 2009).

La cromatografía sólido/líquido se basa en la adsorción de los componentes presentes en la materia prima a grupos funcionales específicos que se ubican en la superficie porosa de una resina y la posterior desorción (Bargeman, 2003).

El proceso patentado de eliminación de la lactosa de la leche descremada mediante cromatografía iónica de exclusión permitió obtener una "bebida láctea libre de lactosa". En este proceso, la leche se divide en dos corrientes, que son finalmente combinadas. En una de ellas, la lactosa es hidrolizada por medio de un procedimiento enzimático tradicional, mientras que en la otra se elimina la lactosa por cromatografía. La resina cargada en una columna permite la separación de la lactosa que no se adhiere y pasa directamente a través del sistema eluyendo por la parte inferior del mismo, de las proteínas e iones que se unen a la resina con carga opuesta (Jelen y Tossavainen, 2003; Harju, 2007; Shakeel-Ur-Rehman, 2009). El producto final tiene una composición similar a la de la leche descremada, pero con un contenido en lactosa muy bajo (aproximadamente 0,01%) y bajo contenido de monosacáridos glucosa y galactosa, lo que origina un menor valor calórico pero el mismo sabor y dulzor de la leche fresca (Jelen y Tossavainen, 2003). La principal desventaja de esta tecnología es su complejidad y tiempo de proceso, y alto costo ya que requiere de equipamiento específico (Shakeel-Ur-Rehman, 2009).

## **8. Yogur reducido en lactosa obtenido por vía enzimática**

Varios estudios demuestran que la digestión de la lactosa mejora con el consumo de yogur, a pesar de que es un alimento que tiene un alto porcentaje ya que en su proceso de obtención sólo se fermenta aproximadamente un 20% de la lactosa presente en la leche de partida (EFSA, 2010). La mejor absorción de la lactosa se cree que es debida en parte a la liberación de enzima  $\beta$ -galactosidasa de los microorganismos durante el tránsito del alimento por el tracto gastrointestinal. Además, algunos le atribuyen la mejor tolerancia del yogur en comparación con la leche, al tránsito más lento por su mayor consistencia (Pochart y col., 1989; Drouault y col., 2002). Sin embargo, otros autores sugieren que el yogur y leches fermentadas tienen un contenido de lactosa que es aún demasiado alto para el consumo por personas con un elevado grado de intolerancia (Dekker y Daamen, 2011; Shaukat y col., 2010; Batista y col., 2008). En efecto, un estudio realizado por Batista y col. (2008) quienes analizaron 110 muestras de yogures y 80 de leches fermentadas, reveló porcentajes de reducción de lactosa altamente variables desde 1,2 hasta 39,8%, tomando

como referencia el contenido de lactosa en la leche (5%). Por lo tanto, las concentraciones residuales de lactosa que quedan en el producto final pueden ser muy elevadas y no ser aptas para las personas intolerantes.

Los antecedentes publicados relacionados a la obtención, características y propiedades de yogur modificado en su contenido de lactosa no son muy abundantes. En particular, se ha evidenciado que la obtención de yogures deslactosados por aplicación del método enzimático se puede llevar adelante tratando la leche con la enzima previamente al proceso de fermentación aunque también se señala la factibilidad de que hidrólisis y fermentación sucedan simultáneamente (Ismail y col., 1983; Toba y col., 1986; Whalen y col., 1988; Rodríguez y col., 2008; Nagaraj y col., 2009). No obstante y según nuestro conocimiento, existen muy pocos trabajos en los cuales se hayan incrementado las propiedades funcionales de yogures deslactosados por la incorporación de cultivos probióticos (Martins y col., 2012; Ibarra y col. 2012), incluso son inexistentes los antecedentes reportados sobre el uso de probióticos junto con prebióticos (yogures simbióticos).

La Legislación Argentina en el Capítulo XVII: Alimentos de régimen o dietéticos, contempla el concepto de “alimentos modificados en la composición glucídica”. En particular, para los productos modificados en la concentración de lactosa en el artículo 1372 se establece lo siguiente: "Con la designación de alimento de contenido bajo en lactosa y de alimento de contenido reducido en lactosa se entiende aquellos alimentos cuyo valor dietario especial resulta de la restricción de los ingredientes que contienen lactosa, la separación de la lactosa del alimento, la descomposición de la lactosa o una combinación de estos métodos. El alimento de bajo contenido de lactosa no contendrá más de 5% de la proporción de lactosa del alimento corriente correspondiente. El alimento de contenido reducido de lactosa no contendrá más del 30% de la proporción del alimento corriente correspondiente. Para la preparación de leche de bajo contenido de lactosa se podrá emplear  $\beta$ -galactosidasa en la proporción necesaria para hidrolizar la lactosa de la leche. Estos alimentos se rotularán con la denominación del producto de que se trate seguida de la indicación bajo en lactosa ó reducido en lactosa. Además deberán llevar la indicación del porcentaje de reducción del contenido de lactosa (95% o 70%) según corresponda, y del contenido de lactosa y galactosa expresado en miligramos por 100 g o 100 mL" (CAAb, 2013).

Teniendo en cuenta que un yogur tradicional conserva alrededor del 80% de la lactosa presente en la leche/mezcla de partida y que yogures bajos y reducidos en lactosa y con propiedades funcionales incrementadas por la incorporación de probióticos y prebióticos



no están al alcance del consumidor en el mercado argentino, el desarrollo de un yogur con estas características sería potencialmente útil para satisfacer las necesidades de un sector de la población con problemas de intolerancia a la lactosa. Como etapa previa a su implementación a escala industrial, se deben realizar estudios a menor escala que permitan establecer los parámetros de elaboración y su influencia en las características finales de los yogures.

---

# OBJETIVOS

---

## **Objetivos de la presente tesis**

### **Objetivo general**

Desarrollar una tecnología para la elaboración de yogur reducido en lactosa y con propiedades funcionales incrementadas, con la finalidad de satisfacer las necesidades de un sector de la población que sufre de intolerancia a este azúcar. De esta manera, el producto obtenido contribuirá a ampliar la oferta en el mercado nacional de productos con estas características y además presentará el beneficio adicional de ser un alimento funcional y de alto valor nutritivo.

### **Objetivos específicos**

- Detectar las condiciones óptimas de incorporación de la enzima  $\beta$ -galactosidasa en experiencias de hidrólisis de leche y de elaboración de diferentes variedades de yogur a escala laboratorio y piloto.
- Estudiar la posibilidad de incorporar al nuevo producto la bacteria probiótica *Lactobacillus acidophilus* y la sustancia prebiótica inulina.
- Evaluar el efecto de las modificaciones tecnológicas introducidas a la tecnología tradicional en los perfiles de ácidos orgánicos y de compuestos volátiles durante la elaboración y almacenamiento del yogur.
- Estudiar la formación de compuestos bioactivos generados durante el proceso de obtención.
- Validar a escala industrial los hallazgos comprobados a menor escala y evaluar su impacto en la calidad sensorial de los productos.

---

# CAPÍTULO I

---

Experiencias Preliminares de  
Hidrólisis / Fermentación

## I.1 Introducción

En la elaboración de yogur sólo una parte de la lactosa presente en la leche de partida es utilizada por las bacterias del cultivo starter como recurso energético. De esta manera, el yogur tiene un contenido de lactosa remanente que es elevado y variable, entre 3 y 5 g/100 g, dependiendo de su formulación (Dekker y Daamen, 2011). Estos niveles de lactosa podrían no ser tolerados por las personas que padecen la dificultad para asimilar este azúcar.

Como fue mencionado anteriormente, una de las estrategias tecnológicas que se utiliza para disminuir la lactosa en el yogur es la hidrólisis enzimática con  $\beta$ -galactosidasa soluble. La misma consiste en adicionar a la leche una determinada dosis de enzima e incubar en condiciones establecidas de pH, temperatura y tiempo que dependen del tipo de enzima empleada y de su actividad, y del porcentaje de disminución de lactosa deseado. Se puede llevar a cabo a bajas temperaturas ( $< 10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), a temperaturas entre 30 y 45  $^{\circ}\text{C}$  o incluso mayores alrededor de 60  $^{\circ}\text{C}$  (Horner y col., 2011; Harju y col., 2012), previamente a la fermentación. En el caso particular de emplear enzimas cuya temperatura óptima sea similar a la que se utiliza en el proceso fermentativo de yogur (38 – 45  $^{\circ}\text{C}$ ) o incluso que posean una actividad hidrolítica aceptable en dicho rango de temperaturas, se presenta la factibilidad de efectuar los procesos de hidrólisis y fermentación de la lactosa en forma simultánea (Saxelin y col., 2003; Tamime y Robinson, 2007; Chryssanthopoulos y Maridaki, 2010).

En el primer caso se produce una extensión en los tiempos de proceso, aunque también se puede hidrolizar la lactosa mientras la leche permanece en refrigeración durante la noche (Dekker y Daamen, 2011). En el segundo caso, en el cual la enzima se adiciona en forma simultánea con el starter, hay que tener en cuenta que el descenso gradual de pH debido a la actividad metabólica del mismo, podría ocasionar, dependiendo del tipo de enzima empleada, una disminución de su actividad o su inactivación total (Tamime y Robinson, 2007).

En el presente trabajo de tesis se empleó una preparación líquida comercial de la enzima  $\beta$ -galactosidasa YNL-2 (GODO Shusei Company Limited, Tokio, Japón) grado alimenticio obtenida por fermentación de una cepa seleccionada de la levadura *K. lactis*. Esta preparación posee una actividad enzimática declarada por el proveedor de 50000 unidades ONPG/g (ONPG: o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido), y condiciones óptimas de temperatura y pH evaluadas sobre una solución patrón de lactosa de 40 – 45  $^{\circ}\text{C}$  y pH = 6, siendo estable en un rango de pH 5,5 – 8. El cultivo starter de yogur utilizado fue YF-L811

(Chr Hansen, Quilmes, Argentina), compuesto por una mezcla de cepas de *S. thermophilus* y *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* en forma de gránulos liofilizados, el cual se empleó en la dosis recomendada. Según el proveedor este fermento produce un yogur con un cuerpo o viscosidad muy alta, sabor muy suave y una postacidificación muy baja.

Las primeras actividades planteadas estuvieron dirigidas a evaluar en ensayos a pequeña escala el efecto del pH inicial de la leche, del momento de incorporación de la enzima y de la dosis de enzima, sobre la hidrólisis de lactosa. Las mejores condiciones fueron posteriormente aplicadas en elaboraciones de yogur a mayor escala (5 L). Se evaluó el proceso de hidrólisis y algunos parámetros de calidad del producto (pH y acidez titulable).

## I.2 Experiencias a escala miniatura

### I.2.1 Materiales y métodos

#### I.2.1.1 Diseño experimental

Se realizaron tres experiencias separadas en las que se evaluó el efecto de tres factores en forma independiente, uno por cada experiencia, sobre el proceso de hidrólisis de lactosa de la leche (**Tabla I.1**).

**Tabla I. 1:** Diseño experimental.

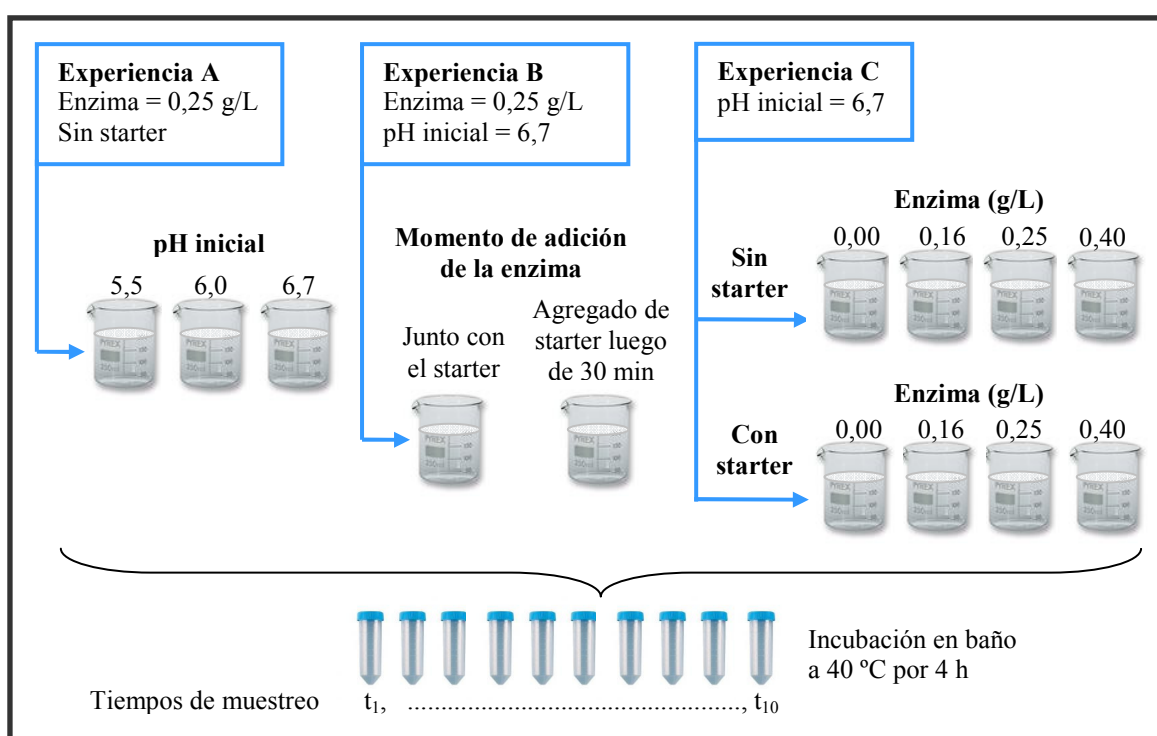
Experiencias	Variables fijas	Factor ensayado	Niveles			
			N1	N2	N3	N4
<b>A</b>	Enzima = 0,25 g/L Sin starter	pH inicial	5,5	6,0	6,7	---
<b>B</b>	Enzima = 0,25 g/L pH inicial = 6,7	Momento de adición de la enzima	Junto con el starter	Previo a la adición del starter (30 min)	---	---
<b>C</b>	pH inicial = 6,7	Enzima (g/L)	0,00	0,16	0,25	0,40
		Starter	Sin adición	Con adición	---	---

Se estudió la influencia del pH de la leche al inicio del proceso de hidrólisis (**A**), el momento de adición de la enzima  $\beta$ -galactosidasa en relación al agregado del starter (**B**) y la dosis de enzima en presencia y ausencia del fermento (**C**). En particular, en la experiencia **A** se estudiaron tres niveles de pH de la leche: 6,7; 6,0 y 5,5, empleando 0,25 g/L de enzima y sin adición de starter. Este ensayo se hizo con el objeto de simular la aplicación real a la que se someterá la enzima. En la experiencia **B**, el momento de adición

de la enzima se ensayó a dos niveles: simultáneamente o 30 minutos previo a la adición del starter, con un pH inicial de 6,7 y una dosis de enzima de 0,25 g/L. Finalmente en la experiencia C se evaluaron dos factores: la dosis de enzima a cuatro niveles 0; 0,16; 0,25 y 0,40 g/L y el fermento a dos niveles: con y sin adición, trabajando a un pH inicial de 6,7. Cada experiencia se efectuó por duplicado y se analizó el porcentaje de hidrólisis. Las dosis de enzima ensayadas se seleccionaron en base a lo sugerido por el proveedor.

### I.2.1.2 Ensayos realizados

El esquema experimental se muestra en la **Figura I.1**.



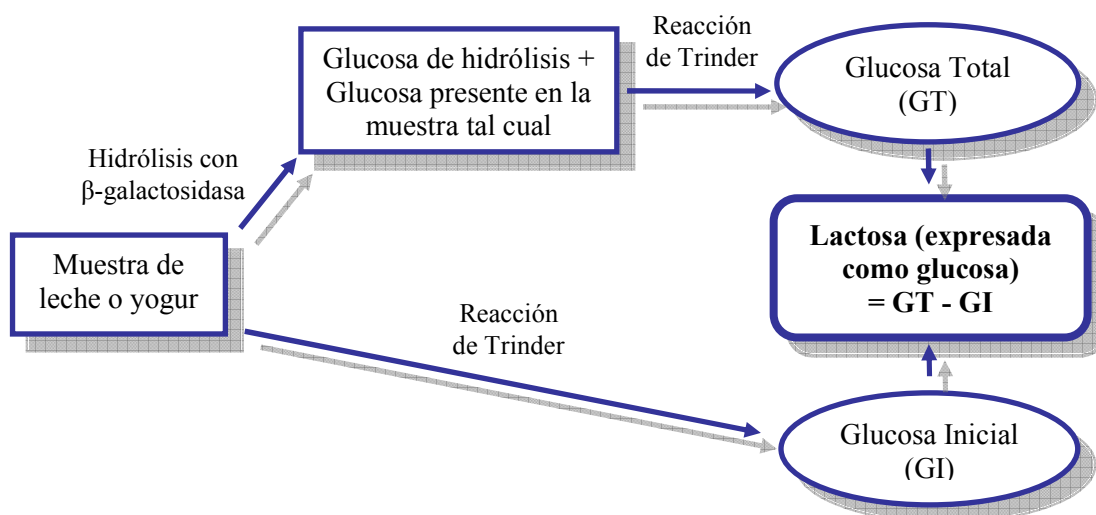
**Figura I. 1:** Esquema experimental.

Para cada nivel del factor ensayado se empleó un volumen de 250 mL de leche UHT (Milkaut S.A., Franck, Argentina), se ajustó el pH con ácido láctico y se adicionó la enzima y el fermento, según corresponda en cada caso. Se distribuyó en tubos Falcon a razón de 25 mL por tubo, se incubaron en baño termostatzado a la temperatura óptima de acción de la enzima y del fermento,  $42 \pm 2$  °C por 4 hs. A distintos intervalos de tiempo se retiraron los tubos del baño para determinar la concentración de lactosa residual y evaluar el porcentaje de hidrólisis.

### I.2.1.3 Determinación de lactosa por método enzimático-colorimétrico

La concentración de lactosa se evaluó indirectamente a través de la determinación de glucosa con el método enzimático-colorimétrico de Trinder empleando los reactivos provistos por un kit comercial (kit para análisis de Glicemia, Wiener Laboratorios, S.A.I.C., Rosario, Argentina). En esta reacción la glucosa se oxida en presencia de glucosa oxidasa (GOD) y el peróxido de hidrógeno formado oxida el cromógeno 4-aminofenazona/fenol a un compuesto coloreado en presencia de peroxidasa (POD), a pH 7,4 y 37 °C. La absorbancia medida a 505 nm es proporcional a la concentración de glucosa.

En los productos deslactosados obtenidos por vía enzimática, además de una baja concentración de lactosa remanente también están presentes los monosacáridos glucosa y galactosa, en relación a lo encontrado en los productos tradicionales que contienen bajos niveles o trazas de glucosa y galactosa (Messia y col., 2007; Tossavainen y Kallioinen, 2007b; Conzuelo y col., 2010). De esta manera para cuantificar la lactosa con el método de Trinder, se debe determinar la glucosa presente en la muestra tal cual (denominada glucosa inicial, GI), hidrolizar la lactosa a glucosa y galactosa utilizando  $\beta$ -galactosidasa y determinar la glucosa total (GT) (glucosa contenida en la muestra tal cual más la glucosa de hidrólisis); el contenido de lactosa se calcula por diferencia entre la glucosa total y la glucosa inicial. El esquema analítico se ilustra en la **Figura I.2.**



**Figura I. 2:** Esquema analítico de la determinación de lactosa por método enzimático-colorimétrico.



*Tratamiento de muestra:*

Se colocó en un matraz de 100 mL aprox. 10 g (peso exacto) de la muestra de leche o yogur y se adicionaron aprox. 20 mL de agua destilada. Luego se agregaron 2 mL de  $\text{ZnSO}_4$  12% p/v, se agitó y se dejó en reposo unos minutos. A continuación se agregaron 2 mL de NaOH 1,25% p/v, se agitó y luego de unos minutos de reposo se diluyó con agua destilada. Se homogeneizó la solución y se filtró a través de papel de filtro. Se realizó una dilución 1:10 del filtrado (muestra clarificada) que se empleó en la determinación de glucosa inicial y total.

*Determinación de glucosa inicial:*

Se colocaron en un tubo de ensayo 200  $\mu\text{L}$  de la muestra clarificada, se completó con agua destilada hasta un volumen de 500  $\mu\text{L}$ , se adicionó 4,5 mL de reactivo de trabajo y se colocó en un baño termostático a 37 °C durante 10 minutos. Luego se dejó enfriar 5 minutos y se midió la absorbancia a 505 nm ( $\text{Ab}_{\text{GI}}$ ). Paralelamente se realizó un blanco de reactivos. Para ello se colocaron 500  $\mu\text{L}$  de agua destilada y 4,5 mL de reactivo de trabajo y se procedió de igual manera.

El reactivo de trabajo se preparó de la siguiente manera: a 500 partes de agua destilada se le adicionan 50 partes de reactivo 4-AF (solución de 4-aminofenazona 25 mmol/L en Buffer Tris 0,92 mol/L), 50 partes de reactivo fenol 55 mmol/L y se diluye a 1000 partes con agua destilada. Se agregan 3 partes de GOD/POD (solución de glucosa oxidasa 1000 U/mL y peroxidasa 120 U/mL) previamente homogeneizada, y se mezcla por inversión.

*Hidrólisis de lactosa y determinación de glucosa total:*

Se colocaron en un tubo de ensayo 200  $\mu\text{L}$  de la muestra clarificada, 200  $\mu\text{L}$  de una dilución 1:10 de la enzima  $\beta$ -galactosidasa (GODO Shusei Company Limited, Japón), se adicionó agua destilada hasta completar un volumen de 500  $\mu\text{L}$  y se colocó en baño termostático a 37 °C durante 30 minutos. Luego se agregaron 4,5 mL de reactivo de trabajo y se colocó nuevamente en baño a 37 °C por 30 minutos, se dejó enfriar 5 minutos y se midió la absorbancia ( $\text{Ab}_{\text{GT}}$ ). Paralelamente se realizó un blanco de enzima colocando 200  $\mu\text{L}$  de la dilución 1:10 de la enzima, agua destilada hasta 500  $\mu\text{L}$  y se procedió de la misma manera.

La dosis de enzima empleada y el tiempo de incubación necesario para lograr la hidrólisis completa de la lactosa presente en la muestra se optimizaron previamente. Para ello se colocaron en tubos de ensayo una cantidad constante de solución patrón de lactosa y

se adicionaron dosis crecientes de enzima, se procedió a la incubación y determinación de glucosa. La dosis adecuada se obtuvo comparando el valor de absorbancia obtenido con el valor de absorbancia previsto por la curva de calibrado de glucosa, para la concentración de glucosa equivalente a la cantidad de lactosa ensayada.

*Curva de calibrado de glucosa:*

Se realizó la curva de calibrado de glucosa, en tres oportunidades diferentes, a partir de una solución madre de 1 mg/mL. Se colocaron cantidades crecientes desde 20 hasta 150 µg, se adicionó agua destilada hasta completar un volumen de 500 µL y se determinó el contenido de glucosa según lo mencionado.

Se observó la existencia de una relación lineal entre el valor de absorbancia y la concentración de glucosa para el intervalo de concentraciones analizado, y se obtuvo un coeficiente de correlación cercano a 1 ( $R^2 = 0,999$ ). Los resultados obtenidos en las tres réplicas realizadas fueron similares por lo que se observó muy buena repetitividad.

El contenido de lactosa se expresó en g/100 g de muestra según la siguiente expresión:

$$\text{Concentración de lactosa (g/100 g)} = \frac{(Ab_{GT} - Ab_{GI}) \times d \times PM_L \times 100}{p \times PM_G \times PM}$$

Donde:

$Ab_{GI}$ : valor de absorbancia obtenido en la determinación de glucosa inicial.

$Ab_{GT}$ : valor de absorbancia obtenido en la determinación de glucosa total.

d: factor de dilución y de corrección de unidades (0,005).

$PM_L$ : peso molecular de la lactosa (342,31 g/mol).

$PM_G$ : peso molecular de la glucosa (180,16 g/mol).

p: pendiente de la curva de calibrado.

PM: peso de muestra (g).

*Estudios llevados a cabo para la implementación de la metodología*

Varios aspectos fueron estudiados para la implementación de este método.

Se evaluó la incidencia de los reactivos clarificantes empleados en el tratamiento de muestra sobre las actividades de las enzimas del kit comercial (GOD y POD) y de la β-galactosidasa. Para el primer caso se realizaron experiencias que consistieron en colocar en tubos de ensayo una cantidad constante de solución patrón de glucosa y cantidades

crecientes de una muestra de leche clarificada (la cual no posee glucosa), de manera de incrementar la concentración de las posibles sustancias interferentes aportadas por los reactivos, y se determinó la glucosa presente. Debido a que los valores de absorbancia obtenidos para las distintas cantidades de muestra adicionada fueron similares al valor de absorbancia de la solución de glucosa sin adición, se concluyó que los reactivos utilizados en el tratamiento de la misma (principalmente sulfato de zinc) no producen un efecto inhibitor sobre las enzimas que intervienen en la reacción de Trinder. Para el segundo caso se realizaron experiencias que consistieron en colocar en tubos de ensayo cantidades crecientes de la muestra clarificada, se adicionó la enzima  $\beta$ -galactosidasa, y se determinó la glucosa presente. Debido a que los valores de absorbancia se incrementaron proporcionalmente con el aumento de la cantidad de muestra y por lo tanto de lactosa, se concluyó que los reactivos usados en el tratamiento de muestra no inhiben la actividad de la enzima  $\beta$ -galactosidasa y por lo que no interfieren en el proceso de hidrólisis.

Estos estudios se realizaron en el marco de una pasantía de investigación que se llevó a cabo previamente al inicio de la tesis doctoral (Vénica, 2009).

#### *Cálculo del porcentaje de hidrólisis*

El cálculo del porcentaje de hidrólisis de lactosa se determinó por la desaparición de lactosa según la siguiente expresión:

$$\% \text{ Hidrólisis} = \frac{(C_i - C_t)}{C_i} \times 100$$

Donde:

$C_i$ : concentración de lactosa determinada en la muestra de leche al inicio del proceso de hidrólisis.

$C_t$ : concentración de lactosa determinada en la muestra de leche/yogur a cada tiempo de muestreo.

#### **I.2.1.4 Análisis estadístico**

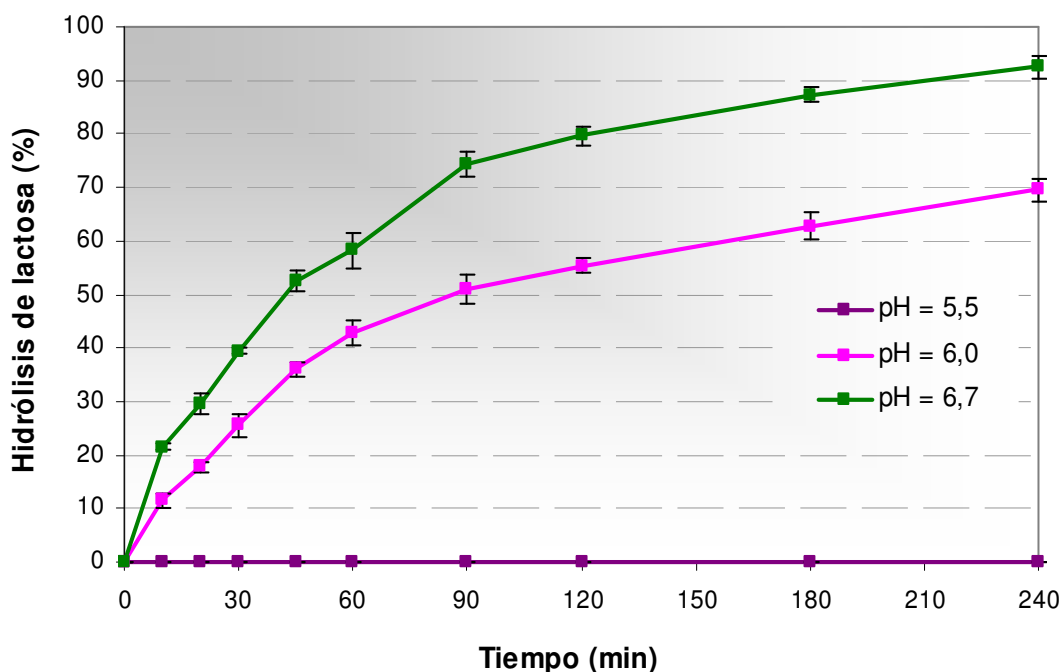
Se calculó el promedio y la desviación estándar y se aplicó un análisis de variancia (ANOVA) de una vía para detectar diferencias significativas entre los tratamientos estudiados y el método de la mínima diferencia significativa (LSD) para comparar las

medias con un 95% de confianza. Para ello se utilizó el software SPSS 10.0 (SPSS Inc., Chicago, USA).

## I.2.2 Resultados y Discusión

### I.2.2.1 Efecto del pH

En la **Figura I.3** se observan los porcentajes promedio de hidrólisis de lactosa obtenidos durante la incubación de leche con la enzima  $\beta$ -galactosidasa a distintos pH.



**Figura I. 3:** Evolución de la hidrólisis de lactosa en leche usando la enzima  $\beta$ -galactosidasa soluble. Las experiencias fueron realizadas a  $42 \pm 2$  °C/4 h con 0,25 g/L de enzima y variando el pH inicial de la leche.

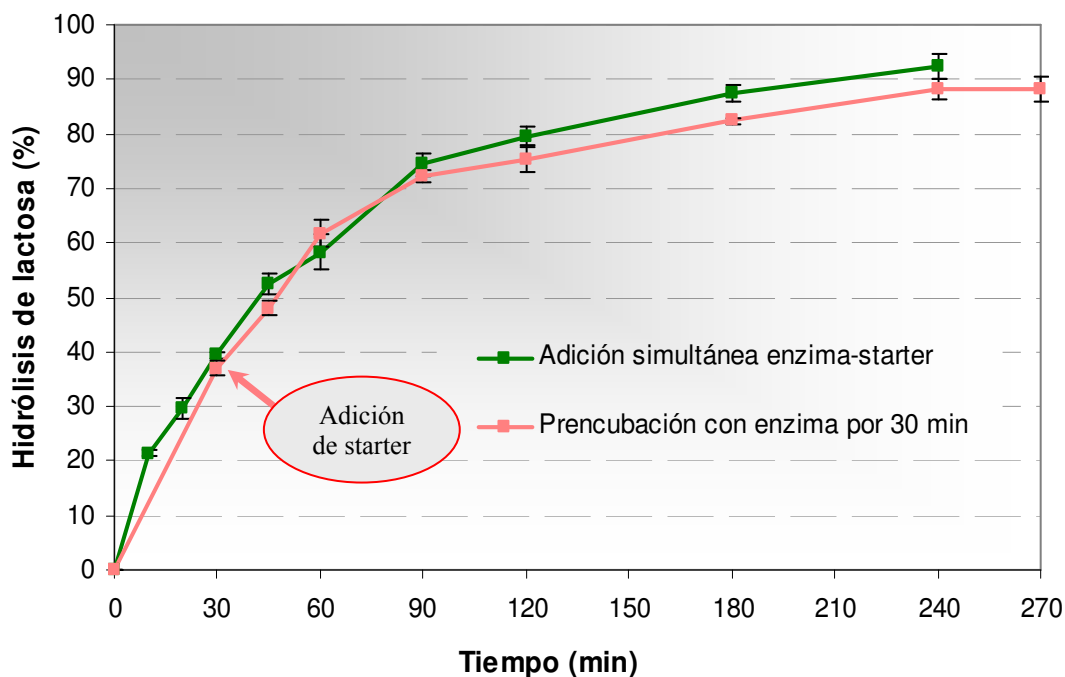
El pH inicial de la leche afectó significativamente ( $p < 0,05$ ) el proceso de hidrólisis de lactosa durante el período de incubación ensayado. El mayor valor de aprox. 92% se obtuvo al final de la incubación en los ensayos a pH 6,7, a pH 6,0 sólo se consiguió hidrolizar la lactosa hasta un 70% y con pH 5,5 la hidrólisis fue nula. Estos resultados difieren de los informados por el fabricante para solución de lactosa-buffer. Kim y col. (1997) encontraron diferencias en la actividad lactasa de *K. lactis* en ensayos llevados a cabo sobre mezclas de reacción (solución de lactosa en buffer fosfato) y sobre leche. De hecho, se han reportado variaciones en la actividad enzimática de lactasa en función del origen de la enzima, tipo y naturaleza del sustrato, como así también por diversos factores

medioambientales (temperatura, pH, medio de reacción, agitación, presencia de iones tales como  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$ ,  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ), debido a que afectan la estructura tridimensional de la enzima o conformación espacial de la proteína.

Matioli y col. (2001) caracterizaron la enzima  $\beta$ -galactosidasa de *K. fragilis* (Lactozym 3000 LAU/L) utilizando leche como sustrato; el máximo de actividad se ubicó a pH 6,5 y retuvo una actividad entre el 50 y 80% a pH 6 dependiendo de la temperatura (45 y 40 °C, respectivamente). Zhou y Chen (2001) reportaron valores de actividad del 70% a 37 °C y pH 6 en solución buffer de ONPG para la enzima libre proveniente de *K. lactis* (Maxilact LX 5000), mientras que al inmovilizarse la actividad fue nula a 37 °C/pH = 6 lo que se atribuyó a una modificación en su conformación. Para esta misma preparación enzimática comercial, Klein y col. (2013) también evidenciaron modificaciones en el rango de pH óptimo de actividad evaluado sobre una solución de lactosa y suero lácteo de acuerdo a que la enzima se encuentre libre o inmovilizada en un soporte. En estado libre la enzima retenía un 50% de actividad a pH 6 en comparación al 100% al estar inmovilizada. Tello-Solís y col. (2005) sugirieron que existe una relación entre la estructura de enzima Maxilact LX 5000 y su actividad, la cual es función del pH. A pH superiores a 7 los cambios en la conformación de la estructura secundaria tales como aumentos en la proporción de hélice favorecen la interacción enzima-sustrato resultando en un aumento de actividad, mientras que estos autores encontraron una disminución drástica de la actividad a pH menores a 6,5 debido a cambios en los residuos cargados de la proteína.

### **I.2.2.2 Efecto del momento de adición de la enzima**

En la **Figura I.4** se presentan los porcentajes promedio de hidrólisis obtenidos durante la incubación de leche con la enzima  $\beta$ -galactosidasa adicionada en diferentes momentos en relación al agregado de fermento.



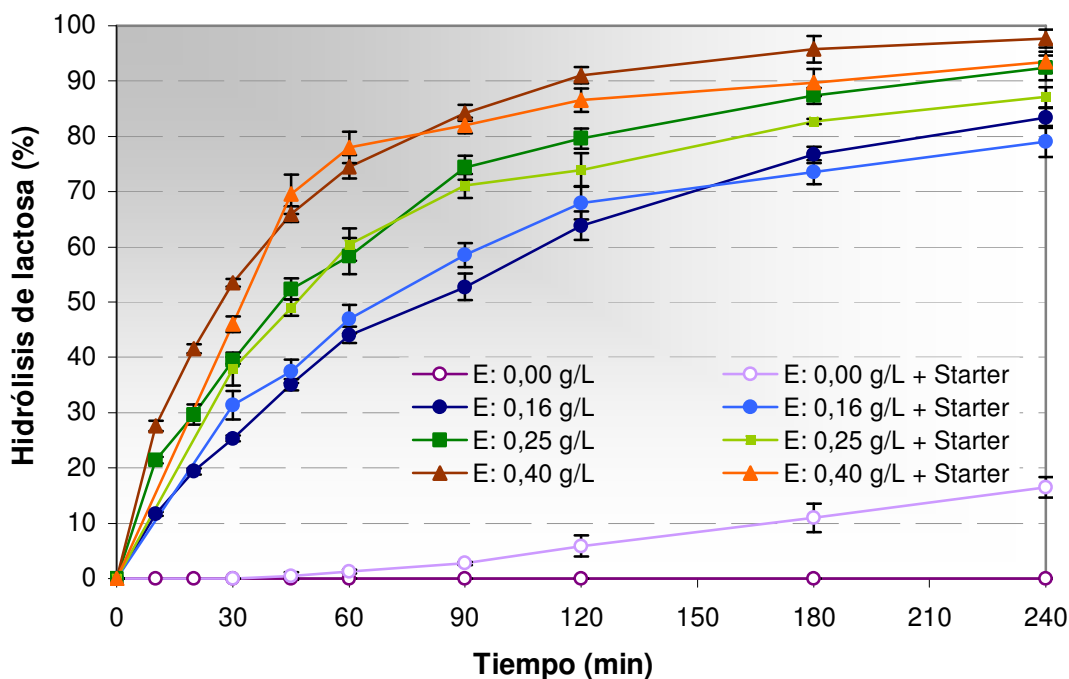
**Figura I. 4:** Evolución de la hidrólisis de lactosa en leche usando la enzima  $\beta$ -galactosidasa soluble. Las experiencias fueron realizadas a  $42 \pm 2$  °C/4 h con 0,25 g/L de enzima y pH 6,7 y con adición del fermento de yogur.

La hidrólisis de lactosa expresada como porcentaje fue similar ( $p > 0,05$ ) en los ensayos de fermentación en los cuales la enzima se adicionó junto con el starter de aquellos en los que se incluyó una etapa de pre-incubación de 30 minutos con la enzima antes del agregado del mismo. En ambos casos los porcentajes estuvieron por encima del 70% a partir de los 90 min y valores muy elevados, de aprox. 90% se obtuvieron a los 240 minutos de incubación.

Resultados reportados por otros autores en relación a este aspecto se discuten en la sección I.3.3.

### I.2.2.3 Efecto de la dosis de enzima en presencia y ausencia del starter

En la **Figura I.5** se muestran los porcentajes promedio de hidrólisis obtenidos durante la incubación de leche con distintos niveles de enzima, en presencia y ausencia del starter.



**Figura I. 5:** Evolución de la hidrólisis de lactosa en leche usando la enzima  $\beta$ -galactosidasa soluble. Las experiencias fueron realizadas a  $42 \pm 2$  °C/4 h y pH 6,7, con diferentes dosis de enzima en presencia y ausencia del fermento de yogur.

La hidrólisis de lactosa se incrementó con el aumento de la dosis de enzima desde 0,16 a 0,40 g/L, tanto en los ensayos realizados con ausencia de starter como aquellos en los que se adicionó el starter junto con la enzima. Los porcentajes obtenidos a los 240 minutos de incubación estuvieron entre 83 y 97% en ausencia de starter, y fueron ligeramente inferiores (entre 80 y 94%) cuando se lo incluyó. Es conveniente aclarar que en los ensayos sin adición de fermento el pH de la leche se mantiene aprox. a 6,7 durante las 4 h de incubación, mientras que en los que se adicionó el mismo el pH de la leche desciende gradualmente por la actividad metabólica de los microorganismos. Por lo tanto, la ligera disminución en el porcentaje de hidrólisis podría ser debida a que se produce una inactivación gradual de la enzima a causa del descenso progresivo de pH.

Por otro lado, la disminución del contenido de lactosa de aprox. 18% en ausencia de enzima y con adición de fermento, se debe exclusivamente a la actividad metabólica de los microorganismos que utilizan la lactosa como fuente de carbono (Tamime y Robinson, 2007).

Resultados reportados por otros autores en relación a este aspecto se discuten en la sección I.3.3.

### I.3 Experiencias a mayor escala

Se realizaron elaboraciones de yogur a mayor escala (5 litros) trabajando al pH normal de leche y empleando las tres dosis de enzima ensayadas anteriormente, la cual se agregó en forma simultánea con el starter. Además, se realizó un ensayo en el que se incluyó una etapa de incubación de la leche con la enzima por 45 min previo a la incorporación del fermento. En todos los casos se incluyeron yogures sin adición de enzima.

#### I.3.1 Materiales y métodos

##### I.3.1.1 Diseño experimental

Se evaluó la influencia de la adición de la enzima en 4 niveles (0,00; 0,16; 0,25 y 0,40 g/L) y con los niveles superiores (0,25 y 0,40 g/L) se incluyó además una etapa de pre-incubación en la preparación de yogures, sobre la hidrólisis de la lactosa y sobre algunos parámetros de calidad global del producto (**Tabla I.2**). Las elaboraciones se realizaron por duplicado.

**Tabla I. 2:** Diseño experimental.

Denominación del yogur	C	E1	E2	E3	E2-Pre	E3-Pre
<b>Factor: Adición de enzima (g/L)</b>	0,00	0,16	0,25	0,40	0,25	0,40

C: control; E: experimental. E-Pre: experimental con pre-incubación.

##### I.3.1.2 Elaboración de yogur

Se realizaron elaboraciones de yogur tipo bebible naturales utilizando el procedimiento convencional (Tamime, 2002) adaptado a escala laboratorio. Para ello, se utilizó un equipo que dispone de 5 tinas de 5 litros de capacidad que trabajan en paralelo (**Fig. I.6**).

La leche pasteurizada y estandarizada en su contenido de materia grasa a 3% p/v (pH  $6,70 \pm 0,05$ , acidez  $14 \pm 1$  °D) fue suministrada por una industria láctea de la zona de Santa Fe (Milkaut S.A., Franck, Santa Fe). La leche se distribuyó en las tinas y se calentó a  $85 \pm 2$  °C durante 10 minutos, se enfrió a  $42 \pm 2$  °C y se inoculó con el starter; en los yogures experimentales (E) se agregó además la enzima  $\beta$ -galactosidasa. En los yogures con una etapa de pre-incubación (E-Pre), en primer lugar se incorporó la enzima y luego de 45 min se adicionó el starter. La incubación se llevó a cabo hasta que el pH alcanzó un valor de  $4,70 \pm 0,10$ , lo que se consiguió en aproximadamente 4 horas. Los productos obtenidos se enfriaron en baño de agua helada hasta 25 °C y luego se almacenaron a 5 °C durante 28 días en envases de vidrio. Se analizó la concentración de lactosa en diferentes momentos



del proceso de fermentación (0, 45 y 150 min y al final de la elaboración) y a los 7, 14, 21 y 28 días de almacenamiento. También se midió el pH y la acidez titulable a la mitad y al final del período de almacenamiento, sólo en los yogures con adición simultánea de enzima y starter y sus respectivos controles.



**Figura I. 6:** Equipamiento utilizado para la elaboración simultánea de 5 yogures diferentes a escala de 5 L.

### **I.3.1.3 Determinaciones analíticas**

#### **✓ Preparación de la muestra para análisis**

La muestra de leche y yogur se termostató en baño de agua a  $40 \pm 1$  °C y se homogeneizó repetidamente por inversión del envase. Luego se enfrió rápidamente a  $20 \pm 1$  °C, bajo agitación, y se pesaron las alícuotas para los diferentes análisis detallados a continuación (FIL-IDF 198:2007).

#### **✓ pH**

La determinación de pH se realizó con un pHmetro digital Orion 3 star benchtop (Thermo Fisher Scientific Inc., USA), provisto de un electrodo combinado (vidrio y calomel) que se calibró con soluciones tampones de pH 7,00 y 4,00. Se colocó directamente el electrodo en la muestra de leche o yogur a temperatura ambiente y se registró el pH una vez estabilizado el valor del mismo (Marshall, 2006).

#### **✓ Acidez titulable**

El desarrollo de ácido láctico por parte de las bacterias lácticas bajo condiciones anaeróbicas y controladas durante el proceso de fermentación es esencial para la formación

adecuada del coágulo en los productos lácteos fermentados, además de ser el componente común que los caracteriza (Marshall, 2006).

En particular, un desarrollo pronunciado de acidez durante el almacenamiento de yogur (postacidificación) no es deseable, ya que puede favorecer la sinéresis, producir defectos de textura y afectar las propiedades organolépticas del yogur (Zourari y col., 1992; Chandan y O'Rell, 2006a).

La medida de la acidez titulable estima principalmente el contenido de ácido láctico en leche y yogur, además de los grupos fosfatos, citratos, grupos ácidos de las proteínas y dióxido de carbono disuelto en la muestra. En particular, el agregado de sólidos lácteos a la leche para yogur produce un aumento en la acidez titulable. Si bien el ácido láctico no es la única sustancia ácido, es la dominante de modo que normalmente el resultado de este análisis se expresa como contenido de ácido láctico (g/100 g). Otra forma de expresión es mediante los grados Dornic, que se relacionan en un factor de 100 con la expresión mencionada (Marshall, 2006). La acidez titulable se usa para seguir el progreso de la fermentación y es uno de los parámetros de calidad más importantes en yogur que se relaciona con la aceptación del consumidor y vida útil del producto (Chandan y O'Rell, 2006a).

La medición de este parámetro se realizó por titulación con solución valorada de NaOH N/9 hasta pH 8,3 (ISO 11869/IDF 150:2012). Para ello, aprox. 15 g (peso exacto) de la muestra de leche o yogur se pesó en un vaso de precipitado, se sumergió el electrodo y bajo agitación magnética se comenzó a adicionar lentamente la solución de álcali contenida en una bureta calibrada. Se registró el volumen gastado al alcanzar la solución un pH de 8,3. El resultado se expresó en grados Dornic ( $0,1 \text{ mL de NaOH N/9} = 1 \text{ °D}$ ).

✓ ***Lactosa por método enzimático-colorimétrico***

Se determinó el contenido de lactosa según la metodología detallada en la sección 2.1.3 del presente Capítulo. Los resultados se expresaron como porcentaje de hidrólisis.

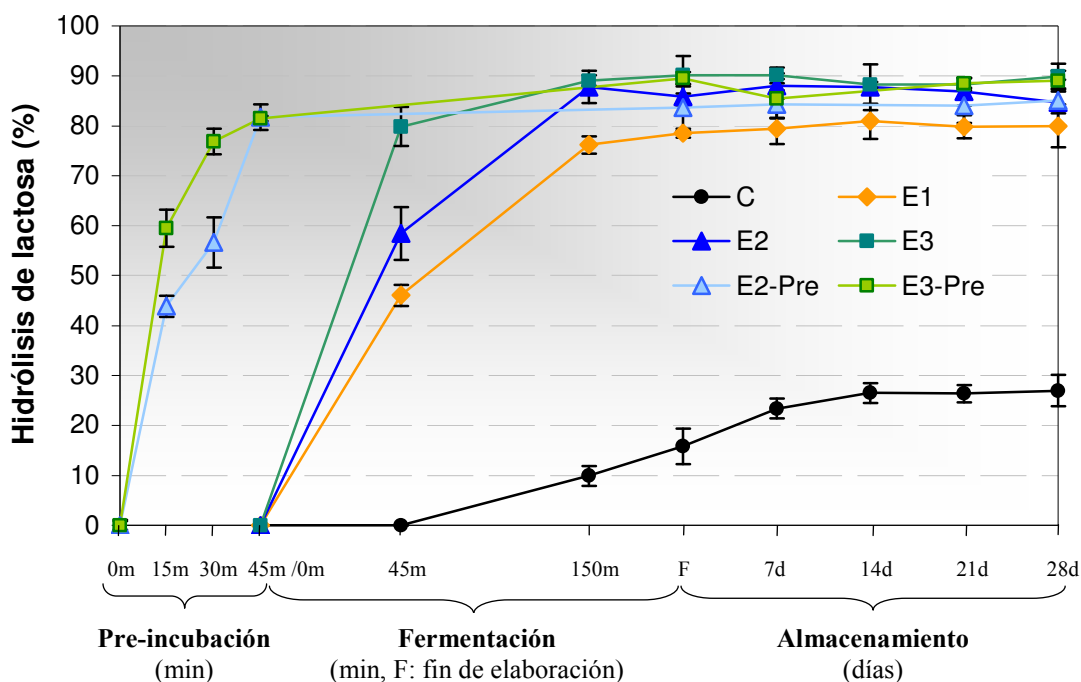
✓ ***Análisis Estadístico***

El análisis estadístico se realizó de la misma manera que el mencionado en la sección 2.1.4 del presente Capítulo.

### I.3.2 Resultados

#### I.3.2.1 Porcentajes de hidrólisis de lactosa

Los resultados de los porcentajes de hidrólisis de lactosa durante la elaboración y almacenamiento de los yogures controles y experimentales se muestran en la **Figura I.7**.



**Figura I. 7:** Porcentajes de hidrólisis de lactosa de los yogures durante la elaboración y el almacenamiento refrigerado (5 °C/28 d).

En los yogures experimentales (**E1**, **E2** y **E3**) los porcentajes se incrementaron bruscamente a medida que el proceso de fermentación se llevó a cabo, también se observó un incremento en el porcentaje con el aumento del nivel de enzima a cada tiempo de muestreo. A los 45 min de incubación los valores fueron superiores al 40% en todos los casos, obteniéndose los mayores porcentajes de hidrólisis a los 150 min, los cuales se mantuvieron relativamente constantes hasta el final de la elaboración. En este momento, los valores estuvieron en el rango de 78 a 90%, siendo los valores para **E3** significativamente mayores ( $p < 0,05$ ) que aquellos obtenidos para **E1**. Durante el almacenamiento refrigerado por 28 días a 5 °C no se observaron cambios y las diferencias significativas entre **E1** y **E3** se mantuvieron.

En los yogures controles (**C**), los porcentajes se incrementaron ligeramente durante la elaboración alcanzando al final del proceso valores de 16%, los cuales fueron significativamente menores ( $p < 0,05$ ) que los valores obtenidos para los experimentales

(E). A los 7 días de almacenamiento refrigerado, los porcentajes se duplicaron y luego se mantuvieron aproximadamente constantes hacia el final del período.

Los porcentajes de hidrólisis obtenidos en los yogures con una etapa de pre-incubación y aquellos en los cuales la enzima y starter fueron adicionados juntos (**E2** y **E2-Pre** y **E3** y **E3-Pre**), resultaron similares tanto al final de la elaboración como durante el almacenamiento. Por lo tanto, el momento de agregado de la enzima no afecta el proceso de hidrólisis de la lactosa por acción de la enzima exógena.

### I.3.2.2 Evolución de pH y acidez titulable

La evolución de pH y acidez titulable durante la conservación bajo refrigeración (5 °C/28 días) de los yogures elaborados, expresados como rangos, se muestran en la **Tabla I.3**.

**Tabla I. 3:** Rango de valores de pH y acidez titulable de los yogures controles y experimentales durante el almacenamiento (5 °C/28 d).

Parámetro	Tiempo (días)	Yogures	
		Controles	Experimentales
pH	0*	4,67 – 4,78	4,70 – 4,80
	14	4,38 – 4,44	4,42 – 4,51
	28	4,32 – 4,43	4,36 – 4,51
Acidez titulable	1	65,1 – 68,2	63,3 – 68,5
	14	72,8 – 75,1	70,3 – 74,6
	28	73,4 – 76,5	70,1 – 74,3

\* Producto recién elaborado. Para los yogures controles el rango se estableció como los valores mínimos y máximos de los duplicados de elaboración; para los yogures experimentales el rango se estableció por el valor mínimo y máximo de 6 yogures (E1, E2 y E3 por duplicado).

Para los yogures experimentales, los mayores valores de pH y menores valores de acidez titulable de los rangos corresponden a los productos con el mayor nivel de enzima.

Los cambios de pH más importantes se produjeron durante los primeros 14 días de almacenamiento y luego se mantuvieron aproximadamente constantes hacia los 28 días.

Diferencias significativas entre los yogures controles y experimentales se encontraron sólo a los 28 días; los valores de pH para los yogures controles y experimentales con la

menor dosis de enzima (**E1**) fueron significativamente menores ( $p < 0,05$ ) que aquellos obtenidos con la mayor dosis (**E3**).

Con respecto a la evolución de la acidez titulable, el incremento en este parámetro siguió un comportamiento inverso al pH. Los cambios más acentuados se produjeron hasta los 14 días y luego los valores se mantuvieron prácticamente constantes hacia el final del período. Los valores de acidez para los yogures **C** fueron significativamente mayores ( $p < 0,05$ ) que aquellos obtenidos para los yogures experimentales **E2** y **E3** a los 28 días de almacenamiento.

### **I.3.3 Discusión**

En algunos trabajos se reporta el empleo de la metodología de incubación de la leche con la enzima  $\beta$ -galactosidasa previamente a la adición del starter para obtener yogur deslactosado, mientras que otros informan como factible la realización del proceso de hidrólisis de la lactosa junto con el de fermentación.

Nagaraj y col. (2009) prepararon yogures a pequeña escala (100 mL) con leche hidrolizada por 1 hora a 40 °C con una enzima proveniente de *K. lactis* (Lactozym 3000L) en dosis variables (desde 0,12 a 0,56%). Los porcentajes de hidrólisis oscilaron entre 46 y 90% dependiendo de la dosis, correspondiendo los mayores valores a la dosis más alta ensayada. Los productos obtenidos con niveles de hidrólisis de lactosa del 50 y 70% presentaron características sensoriales superiores a los no hidrolizados, aunque aquellos con 90% de hidrólisis tuvieron una aceptabilidad inferior. Whalen y col. (1988) e Ibarra y col (2012) hidrolizaron la leche con una lactasa también obtenida de *K. lactis* (Maxilact LX5000) previo a la elaboración de yogures (0,5 y 1 L, respectivamente). En el primer trabajo, la hidrólisis se llevó a cabo a 32 °C hasta lograr disminuciones de lactosa del 50 y 75%; en el segundo, la incubación se produjo a 37 °C durante aprox. 2 horas con la que se consiguió un 80% de hidrólisis. Los resultados obtenidos por ambos grupos de investigadores fueron satisfactorios, no se evidenciaron inconvenientes durante el proceso de fermentación al emplear como materia prima una leche con contenidos reducidos en lactosa; los yogures hidrolizados presentaron características comparables a los no hidrolizados.

Por el contrario, Toba y col. (1986) ensayaron el procedimiento de agregado de la enzima junto con el starter en la elaboración de yogur (100 mL), utilizando dos preparaciones comerciales de lactasas provenientes de *A. oryzae* (Galantase y Sumylact L).

Los porcentajes de hidrólisis obtenidos luego de 8 h de incubación a 41 °C fueron de aprox. 64 y 58% para la menor dosis ensayada (4,7 unidades/100 mL) de Galactase y Sumylac L, respectivamente, y se logró una hidrólisis prácticamente completa con una mayor dosis de ambas enzimas (93 unidades/100 mL). También se observó que el contenido de lactosa en los yogures continuó disminuyendo durante el almacenamiento refrigerado hasta 91 y 72% para Galactase y Sumylac L, respectivamente, lo que se atribuyó a que las enzimas permanecieron activas a la temperatura de refrigeración y al pH ácido del yogur. Los autores no observaron cambios durante el proceso de elaboración de los yogures deslactosados en comparación a yogures elaborados en paralelo pero sin el agregado de la enzima.

Las dos alternativas fueron comparadas por Ismail y col. (1983) y Martins y col. (2012). En el primer trabajo se prepararon yogures a escala de 1 y 5 litros ensayando la pre-incubación de la leche a 43 °C con las enzimas Lactozym y Maxilact y el agregado simultáneo enzima-fermento, usando diferentes niveles de enzima (300 – 1000 unidades/L); yogures sin adición de enzimas fueron usados como control para cada caso. No se observaron cambios durante el proceso de elaboración en comparación al control para cada uno de los procedimientos ensayados, tampoco se apreciaron diferencias entre ambas enzimas. Los productos hidrolizados presentaron características organolépticas similares a los controles. Los autores sugirieron como más adecuado el segundo procedimiento debido a que en el primero se podría llegar a producir alguna contaminación microbiana durante la hidrólisis que implicaría la aplicación de un tratamiento térmico adicional previo al proceso de fermentación lo que ocasiona un mayor tiempo de proceso incidiendo negativamente en los costos. En el segundo trabajo se estudió una preparación enzimática compuesta por  $\beta$ -galactosidasas de *K. lactis* y *A. niger* (Lactomax Flex) (0,5; 0,75 y 1 g/L) en la elaboración de yogur (2 L). Altos niveles de conversión de lactosa (superior al 95%) se lograron con cualquiera de las dosis de enzima ensayadas y con el agregado simultáneo enzima-fermento. Sin embargo, se prefirió la menor dosis de enzima ya que en estas condiciones no se observaron cambios negativos en algunas propiedades físicas del yogur.

Con respecto al pH y acidez titulable, similares observaciones a las obtenidas en este trabajo de tesis fueron realizadas por Toba y col. (1986), quienes reportaron valores de pH más elevados y por lo tanto valores de acidez titulable inferiores para los yogures hidrolizados comparados a los controles no hidrolizados. Por el contrario, según Nagaraj y

col. (2009) el desarrollo de acidez fue más pronunciado en los yogures hidrolizados con respecto a los no hidrolizados.

#### **I.4 Conclusiones**

Se estudiaron distintas condiciones de hidrólisis de lactosa empleando una preparación comercial soluble de enzima  $\beta$ -galactosidasa proveniente de la levadura *K. lactis*, con el propósito de preparar yogures con contenido de lactosa inferior a los productos tradicionales.

En ensayos de hidrólisis y fermentación a escala miniatura y laboratorio se logró reducir el contenido de lactosa de la leche por encima del 70% adicionando desde 0,16 hasta 0,40 g/L de enzima, sin ser necesario modificar el pH inicial de la leche. Un hecho que resulta ser importante desde el punto de vista industrial, es que ambos procesos: hidrólisis con enzima exógena y fermentación por acción microbiana, se llevaron a cabo satisfactoriamente en forma simultánea, por lo que la enzima y el fermento se pueden adicionar al mismo tiempo a la leche o mezcla de partida para preparar yogur. Estas condiciones se aplicaron en las experiencias que se describen en los capítulos siguientes.

---

# CAPÍTULO II

---

Ensayos de Hidrólisis de Lactosa en  
Modelos de Diferentes Variedades de  
Yogur a Escala Laboratorio



## II.1 Introducción

La leche destinada a la elaboración de yogur puede ser fortificada/estandarizada con diferentes ingredientes lácteos concentrados (leche o suero), en polvo (leche, suero o caseinatos) o se puede remover el agua por filtración con membranas, para aumentar los sólidos totales, principalmente el contenido de proteínas, de manera de obtener un producto con diferente consistencia: líquida o semi-sólida. Algunos de los ingredientes más ampliamente utilizados son la leche descremada en polvo (LDP) y el concentrado de proteína de suero (WPC), que no sólo aportan proteínas sino también lactosa (contienen aproximadamente 50 g/100 g) a la leche base y en consecuencia se incrementará el contenido de lactosa del yogur elaborado (Chandan y O'Rell, 2006b; Tamime y Robinson, 2007).

Durante el proceso de fermentación ácido-láctica la intensa actividad metabólica del cultivo starter sobre la lactosa conduce a cambios profundos en la química, física, microbiología y en las características sensoriales de la leche. Varios ácidos orgánicos son producidos dependiendo de la especie y cepa de las bacterias que componen el fermento de yogur, la composición del medio, las condiciones de incubación y de almacenamiento (Chick y col., 2001; Tormo y Izco, 2004; Urbiene y Leskauskaite, 2006; Martínez-Villaluenga y col., 2006; Ekinci y Gurel, 2008). El ácido láctico es el principal compuesto producido y es el responsable de la disminución de pH que conduce a la desestabilización de la matriz proteica; también otorga al yogur un sabor fuerte y ácido. Los ácidos acético (o acetato), butírico, úrico y fórmico son también generados a partir de la lactosa y contribuyen al sabor y aroma del yogur y algunos actúan como conservantes (Fernández-García y McGregor, 1994; Walstra y col., 1999; Adhikari y col., 2002; Tamime y Robinson, 2007; Gürakan y Altay, 2010). El ácido cítrico (o citrato), y en menor medida los ácidos hipúrico y orótico, son compuestos naturales de la leche. El citrato puede ser catabolizado por las bacterias ácido lácticas para la producción de ácido láctico y algunos compuestos volátiles (acetaldehído, diacetilo, acetoína), el ácido hipúrico se puede convertir en ácido benzoico, mientras que el ácido orótico participa en la síntesis de ácidos nucleicos (Sieber y col., 1995; Liu, 2003; Tamime y Robinson, 2007). El ácido pirúvico (o piruvato) es un intermediario clave que proviene del metabolismo de la lactosa (vía Embden-Meyerhoff) y se transforma en ácido láctico, o puede originarse a través del metabolismo del citrato para derivar a compuestos de aroma (Vedamuthu, 2006).

Al incorporar la enzima  $\beta$ -galactosidasa en la elaboración de yogur se produce una modificación en el perfil de carbohidratos de la matriz y por lo tanto en la fuente de

energía disponible para los microorganismos. Este hecho podría conducir a cambios en el perfil de ácidos orgánicos de los yogures elaborados. De hecho, la glucosa también es metabolizada a piruvato y luego convertido en ácido láctico, mientras que el metabolismo de la galactosa es cepa dependiente pero en general se acumula en el medio (Gürakan y Altay, 2010; Robinson, 2011). Según nuestro conocimiento, no existen datos publicados en relación al perfil de ácidos orgánicos en yogur deslactosado.

El objetivo del presente Capítulo fue evaluar la influencia de la adición de la enzima  $\beta$ -galactosidasa (en diferentes dosis) y de la suplementación con sólidos lácteos (en diferentes niveles) lo que conduciría a modificar el contenido de lactosa de la leche de partida, en la elaboración de yogures naturales y endulzados a escala laboratorio de 5 litros, sobre la actividad metabólica de los microorganismos del fermento mediante el análisis de los perfiles de azúcares y de ácidos orgánicos y sobre algunos parámetros de calidad (pH, acidez titulable, sinéresis y composición química global).

## II.2 Materiales y métodos

### II.2.1 Diseño experimental

Se empleó un diseño factorial completo donde se evaluó la influencia de dos factores: enzima  $\beta$ -galactosidasa (F1) y sólidos lácteos (F2) a tres niveles cada uno, en la elaboración de yogures naturales y endulzados.

Los niveles (N) estudiados fueron para F1: 0,00; 0,25; 0,40 g/L y para F2: 0,0; 2,2; 4,4 g/100 mL de una mezcla compuesta por leche en polvo descremada (LPD), concentrado de proteínas de suero al 35% (WPC 35%) y pectina (Pe), en una relación 1,125/1,000/0,075, respectivamente (**Tabla II.1**). De esta manera, se elaboraron 9 yogures diferentes ( $N^F = 3^2 = 9$ ) para las variedades natural y endulzado, respectivamente. Las elaboraciones se realizaron por triplicado resultando un total de 27 yogures naturales y 27 yogures endulzados. La denominación de los productos se presenta en la **Tabla II.2**.

Los niveles de enzima empleados se seleccionaron en base a los resultados obtenidos en ensayos previos. En elaboraciones de yogur tipo batido (con adición de 4,4% de sólidos) usando 0,16 g/L de enzima, se obtuvieron porcentajes de hidrólisis entre 65 y 72% (datos no mostrados). En estas condiciones no siempre se alcanza el nivel de reducción de lactosa requerido para obtener un “alimento de contenido reducido en lactosa” según lo que establece la Legislación Argentina (CAAb, 2013).

Los niveles de sólidos lácteos a emplear se establecieron en función de los valores normales utilizados habitualmente en la industria para yogures tipo batido; concentraciones

más elevadas derivan en productos con demasiada consistencia e incluso pueden producir sabores indeseables (Chandan y O'Rell, 2006b). La pectina se emplea como estabilizante, lográndose modificaciones en la consistencia con el empleo de muy pequeñas cantidades (0,07 – 0,15%); el uso de mayores niveles ocasiona defectos de arenosidad y disminución de viscosidad (Chandan y O'Rell, 2006b).

**Tabla II. 1:** Diseño experimental.

Factor ensayado	Niveles		
	N0	N1	N2
F1: Enzima (g/L)	0,00	0,25	0,40
F2: Sólidos lácteos (g/100 mL)	0,0	2,2	4,4

**Tabla II. 2:** Denominación de los yogures.

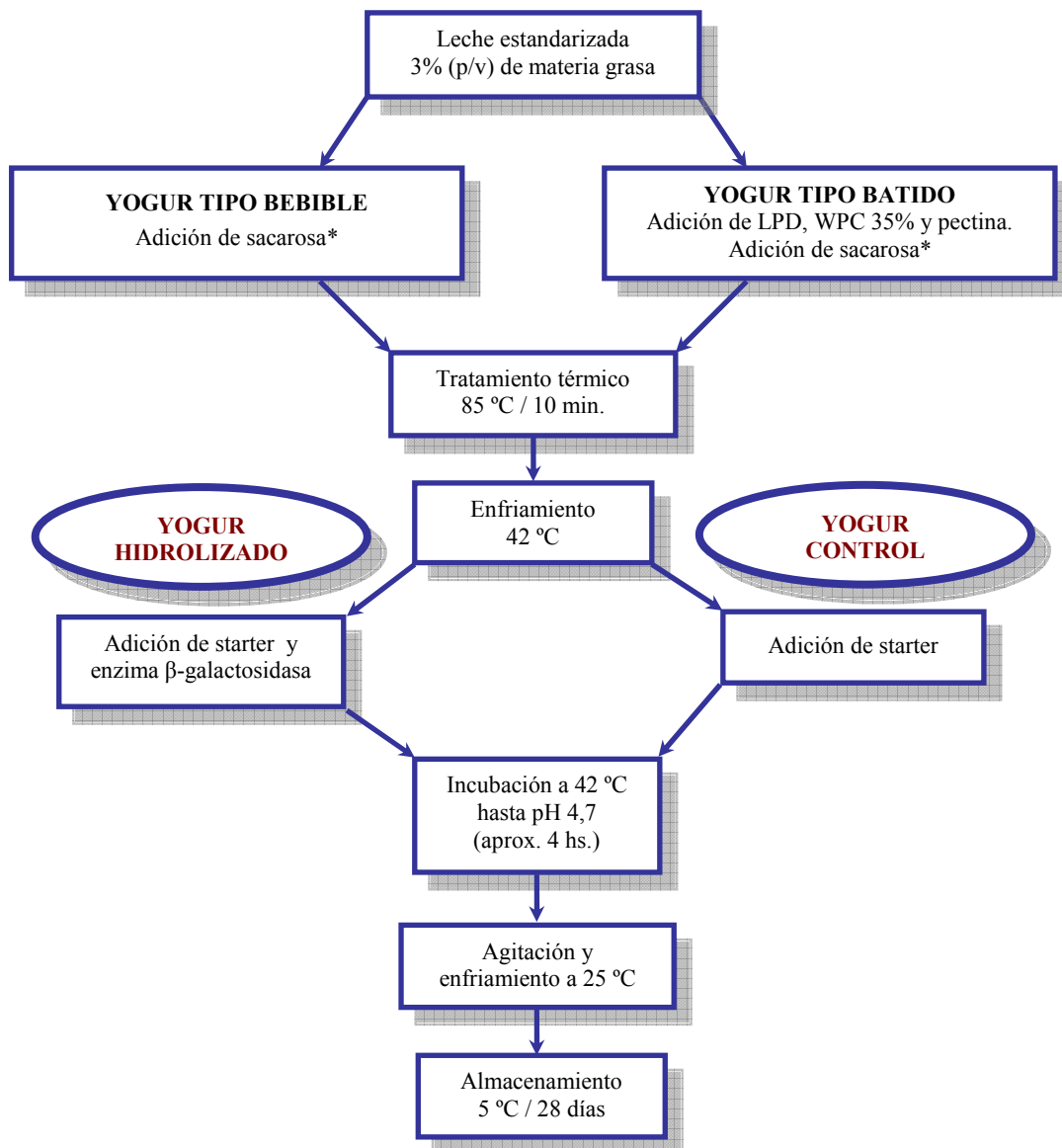
Yogur natural	Yogur con sacarosa	F1: Adición de enzima (g/L)	F2: Adición de sólidos lácteos (g/100 mL)	Tipo de yogur
C	Cs	0,00	0,0	
H1	H1s	0,25	0,0	Bebible
H2	H2s	0,40	0,0	
CI	CI s	0,00	2,2	
H1I	H1Is	0,25	2,2	
H2I	H2Is	0,40	2,2	
CII	CII s	0,00	4,4	Batido
H1II	H1IIs	0,25	4,4	
H2II	H2IIs	0,40	4,4	

C: control; H: hidrolizado; 1 y 2: nivel de enzima; I y II: nivel de sólidos lácteos; s: sacarosa.

### II.2.2 Elaboración de yogur

Se empleó el protocolo descrito en la sección 3.1.2 del Capítulo I con algunas modificaciones que se detallan a continuación. Previamente al tratamiento térmico, se adicionaron a la leche la sacarosa 8% p/v (Ingenio Ledesma S. A., Tucumán, Argentina), la LPD (Milkaut S. A., Franck, Argentina), el WPC 35 % (Milkaut S. A., Franck, Argentina) y la Pe (Genupectin LM 104 AS, Dinamarca), según corresponda, y se siguió con el procedimiento. Se tomaron muestras en diferentes momentos durante el proceso de fermentación (0, 45 y 150 min y al final de la elaboración) y durante la vida útil (1, 7, 14, 21 y 28 días) para analizar pH, acidez titulable, sinéresis y perfiles de azúcares (lactosa,

glucosa y galactosa) y de ácidos orgánicos (láctico, cítrico, acético, butírico, hipúrico y orótico). A los 7 días se realizó el análisis de composición global (grasa, sólidos totales y proteínas totales). El esquema de elaboración se muestra en la **Figura II.1**.



\* La sacarosa se incorporó en los yogures endulzados.

**Figura II. 1:** Esquema de elaboración de los distintos yogures.

### II.2.3 Determinaciones analíticas

La preparación de la muestra para los análisis se realizó según lo descrito en la sección 3.1.3 del Capítulo I.

---

---

✓ **Sólidos totales**

El método más simple para determinar los sólidos totales en los productos lácteos involucra la evaporación del agua de una cantidad conocida de muestra y el registro del peso de la muestra seca (Marshall, 2006).

En este trabajo los sólidos totales se determinaron mediante el método indirecto de secado en estufa a  $102 \pm 2$  °C hasta pesada constante, aplicando una etapa previa de secado en baño de vapor lo que permite disminuir el tiempo de exposición en estufa evitando la caramelización de los azúcares presentes en la muestra (FIL-IDF 21B: 1987; FIL-IDF 151:2005).

Un cristalizador de aluminio conteniendo aprox. 25 g de arena tratada (lavada con ácido clorhídrico, secada y tamizada) y una varilla de vidrio, se secó en estufa (102 °C). El cristalizador tapado se colocó en desecador hasta que alcanzó la temperatura ambiente y se registró el peso. Se agregaron aprox. 5 g (peso exacto) de la muestra de yogur en el recipiente, se adicionaron 5 mL de agua destilada, se homogeneizó con ayuda de la varilla y se colocó en baño maría durante 30 min, mezclando intermitentemente para aumentar la superficie de contacto y facilitar el proceso de evaporación. A continuación, se colocó en estufa a  $102 \pm 2$  °C hasta pesada constante, lo que se consiguió en aproximadamente 3 h. El cristalizador tapado se enfrió en desecador hasta temperatura ambiente y se pesó. El resultado se obtuvo por diferencia de peso de la muestra antes y luego del secado y se expresó en g/100 g.

✓ **Materia grasa**

El contenido de materia grasa se determinó con el método volumétrico de Gerber, utilizando el butirómetro de leche fluida y empleando  $\text{H}_2\text{SO}_4$  de  $\delta = 1,77$  (Bradley y col., 1992).

En un butirómetro conteniendo 10 mL del ácido se agregaron 11 mL de una dilución de la muestra de yogur (1:1 p/v; 20 g en 20 mL de agua destilada). Se adicionó lentamente por las paredes 1 mL de alcohol amílico, se tapó y se agitó el butirómetro con suavidad. Luego se colocó en un baño a 60 – 70 °C para favorecer la completa digestión de la muestra, se centrifugó durante 10 minutos en la centrífuga de Gerber para facilitar la liberación de grasa. Se sumergió nuevamente en el baño por 10 minutos a 65 °C y se realizó la lectura midiendo la altura de la columna de grasa en la escala graduada del butirómetro. El resultado se obtuvo multiplicando la lectura leída por el factor de dilución (2) y se expresó en g/100 g.

---

---

✓ **Proteínas totales**

El contenido de nitrógeno total se determinó por el método de Kjeldahl (FIL-IDF 20-1: 2001), a partir del cual se calculó el contenido de proteína total. El método se basa en digerir la muestra con ácido sulfúrico para convertir el nitrógeno proteico y no proteico en sales de amonio. Luego la solución digerida se alcaliniza en exceso y el amoníaco liberado se destila y se recoge en solución de ácido bórico. Posteriormente, se lleva a cabo la titulación del borato de amonio formado con una solución valorada de ácido sulfúrico.

Se pesaron aprox. 2 g (peso exacto) de la muestra de yogur y se colocaron en el tubo de digestión. Se adicionaron los reactivos necesarios para la digestión, aprox. 4,8 g de  $K_2SO_4$ , 140 mg de  $Cu_2SO_4 \cdot 5H_2O$ , 140 mg del catalizador  $TiO_2$  y 10 mL de  $H_2SO_4$  concentrado, la cual se llevó a cabo en una unidad digestora para seis tubos con sistema de aspiración de humos (Büchi Digestion Unit K-424, Suiza). El proceso de calentamiento se realizó siguiendo un gradiente de temperaturas establecido hasta que el líquido presentó una apariencia translúcida y límpida. Luego se procedió a la destilación en un equipo de destilación por arrastre con vapor automático (Büchi Distillation Unit B-324, Suiza). Para ello se agregaron 70 mL de NaOH 32% p/v para la alcalinización del medio, los vapores se recogieron en un erlenmeyer conteniendo 60 mL de  $H_3BO_4$  2% p/v y gotas de una solución indicadora compuesta por rojo de metilo (0,1% p/v) y azul de metileno (0,15% p/v) en alcohol etílico 96% (pH de viraje 4,65). Finalmente, se realizó la titulación manual del borato de amonio formado, con una solución valorada de  $H_2SO_4$  0,1 N hasta viraje del color (verde a rosado) utilizando una microbureta de 5 mL de capacidad. El resultado del contenido de nitrógeno se expresó en g/100 g y el de proteínas totales se obtuvo multiplicando por el factor 6,38 correspondiente a productos lácteos.

✓ **pH y acidez titulable**

Los análisis de pH y acidez titulable fueron realizados de acuerdo a lo detallado en la sección 3.1.3 del Capítulo I.

✓ **Sinéresis**

La sinéresis se define como la expulsión o separación de suero de la matriz proteica que se hace visible en la superficie del producto y está directamente relacionada con el grado de perturbación física a la que se somete la muestra, aunque también puede ser el resultado de un procesamiento inadecuado (Tamime y Robinson, 2007; Lee y Lucey, 2010). Este parámetro es considerado un defecto en yogur y afecta negativamente la percepción del

consumidor. Para evitar o minimizar este defecto se utilizan diferentes estrategias tales como el empleo de espesantes/estabilizantes (pectina, gelatina, almidón), el incremento del contenido de sólidos totales de la leche base o el uso de starters que contengan cepas productoras de exopolisacáridos (EPS) (Amatayakul y col., 2006). En particular, los EPS son polímeros compuestos principalmente por unidades de glucosa, galactosa y en menor medida de ramnosa, manosa, fructosa y N-acetil-galactosamina (Rizzello y De Angelis, 2011).

Si bien existen varios métodos para evaluar la expulsión de suero (centrifugación o filtración de una muestra de yogur), una prueba sencilla se basa en el movimiento espontáneo del suero bajo la fuerza de la gravedad (Dello Staffolo y col., 2004; Amatayakul y col., 2006; Mahdian y Tehrani, 2007; Mazloomi y col., 2011). En este trabajo para la medición de la sinéresis se empleó esta prueba según el procedimiento utilizado por Dello Staffolo y col. (2004). Para ello, la muestra de yogur se colocó en una probeta de 100 mL y se conservó a 5 °C durante 28 días. A intervalos de 7 días se midió el volumen de suero que se hace visible en la superficie y se expresó como porcentaje (v/v) de sinéresis.

#### ✓ *Perfiles de carbohidratos y de ácidos orgánicos por HPLC*

Durante el transcurso del desarrollo de este trabajo de tesis se adquirió un detector de Índice de Refracción (IR) y software Chromera® que se acopló al equipamiento de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) existente, y se implementó una metodología de HPLC-IR para cuantificar el perfil de carbohidratos (Ingignoli, 2013). Simultáneamente se pudo analizar el perfil de ácidos orgánicos de acuerdo a Zeppa y col. (2001), con algunas modificaciones, debido a que se dispone del detector UV-visible. De esta manera, este procedimiento analítico que permitió determinar la concentración de carbohidratos y de ácidos orgánicos fue el utilizado para los subsiguientes análisis de los productos en reemplazo al método enzimático mencionado en la sección 2.1.3 del Capítulo I. Las condiciones de análisis fueron las siguientes:

Se pesaron aprox. 5 g (peso exacto) de muestra de leche o yogur y se diluyó a 50 mL con 10 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La suspensión se homogeneizó y centrifugó a 15000 g/20 min/4 °C. Se filtró el sobrenadante a través de una membrana de 0,45 µm (Millex, Millipore, São Paulo, Brazil) y se inyectó en el cromatógrafo usando un loop de 60 µL. La separación cromatográfica se realizó isocráticamente a 65 °C con una fase móvil de 10 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y un flujo de 0,6 mL/min, en una columna Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm) equipado con

un cartucho guarda columna (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). El equipo de HPLC consiste de una bomba cuaternaria, desgasificador en línea (Series 200), detector de IR (Series Flexar) y detector UV-visible (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA). Los datos fueron procesados con el software Chromera® (Perkin Elmer, Norwalk, USA). Para la detección de los compuestos la temperatura del IR fue de 35 °C y la longitud de onda del detector UV de 210 nm. La cuantificación se realizó usando las curvas de calibrado preparadas con soluciones patrones de los azúcares y de los ácidos orgánicos de interés (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA).

La glucosa y galactosa se cuantificaron solamente en los yogures naturales, ya que en las condiciones cromatográficas utilizadas: medio ácido y alta temperatura, se produce la inversión de la sacarosa con formación de sus monosacáridos constituyentes fructosa y glucosa; el pico de la fructosa se solapa con el de la galactosa y el pico de la glucosa es el resultado de la glucosa presente en la muestra de yogur y la generada en las condiciones de análisis.

#### ✓ *Análisis Estadístico*

Se utilizó el software SPSS 10.0 (SPSS Inc, Chicago, USA). Los diferentes parámetros se analizaron por ANOVA de dos vías para cada tiempo de muestreo, con el propósito de detectar diferencias significativas entre los tratamientos estudiados utilizando el modelo lineal general y el test de Tukey con un 95% de confianza para comparar las medias.

### **II.3 Resultados**

#### **II.3.1 Composición global y sinéresis**

Los parámetros de composición global fueron analizados para los yogures batidos naturales y endulzados con el nivel 2 de sólidos lácteos. Debido a que no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los yogures hidrolizados y controles, los valores se promediaron y se muestran en la **Tabla II.3**.



**Tabla II. 3:** Contenido de materia grasa, sólidos totales y proteínas de los yogures batidos naturales y endulzados (valores promedio de los yogures controles y hidrolizados).

<b>Parámetro medido (g/100 g)</b>	<b>Yogures naturales</b>	<b>Yogures endulzados</b>
<b>Materia grasa</b>	2,7 ± 0,1	2,6 ± 0,1
<b>Sólidos totales</b>	15,18 ± 0,37	20,41 ± 0,21
<b>Proteínas totales</b>	4,63 ± 0,15	4,20 ± 0,13

Los valores fueron adecuados para cada variedad. La sacarosa adicionada en los yogures endulzados produjo un aumento en los valores de sólidos totales y provocó una ligera disminución en el contenido de proteínas.

La sinéresis se incrementó progresivamente durante el almacenamiento refrigerado principalmente en los yogures sin adición de sólidos lácteos (N0), en menor medida en los productos con el nivel intermedio (N1) y no presentaron suero en la superficie los que tenían el nivel más elevado (N2). Se observaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) con la adición de sólidos lácteos, mientras que el agregado de la enzima no modificó significativamente ( $p > 0,05$ ) este parámetro. Los yogures con sacarosa presentaron valores ligeramente inferiores que los naturales (**Tabla II.4**).

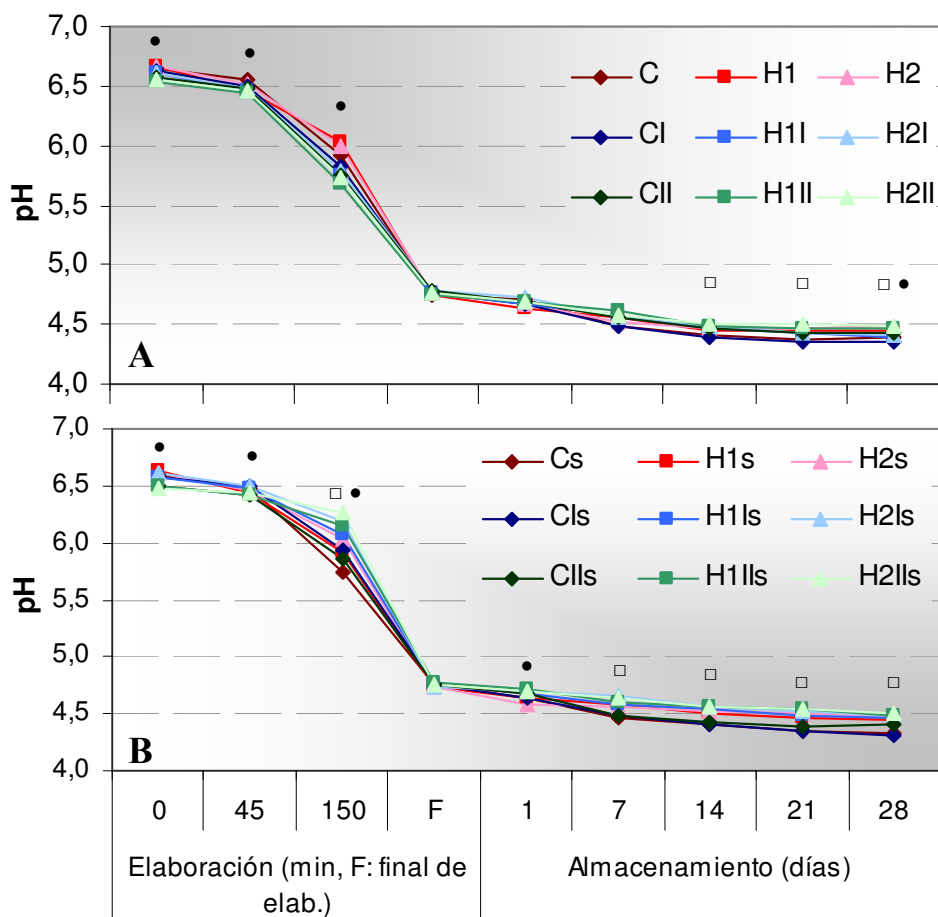
**Tabla II. 4:** Porcentaje de sinéresis en yogures naturales y endulzados a los 28 días de almacenamiento a 5 °C.

<b>Yogur natural</b>	<b>Sinéresis (% v/v)</b>	<b>Yogur con sacarosa</b>	<b>Sinéresis (% v/v)</b>
<b>C</b>	10,0 ± 2,0 <sup>a</sup>	<b>Cs</b>	7,0 ± 0,5 <sup>a</sup>
<b>H1</b>	9,8 ± 1,9 <sup>a</sup>	<b>H1s</b>	7,3 ± 0,8 <sup>a</sup>
<b>H2</b>	10,8 ± 1,3 <sup>a</sup>	<b>H2s</b>	8,2 ± 1,0 <sup>a</sup>
<b>CI</b>	1,0 ± 0,5 <sup>b</sup>	<b>CI s</b>	0,5 ± 0,5 <sup>b</sup>
<b>H1I</b>	1,0 ± 0,5 <sup>b</sup>	<b>H1I s</b>	1,0 ± 0,5 <sup>b</sup>
<b>H2I</b>	1,5 ± 1,0 <sup>b</sup>	<b>H2I s</b>	1,0 ± 0,5 <sup>b</sup>
<b>CII</b>	nd <sup>c</sup>	<b>CII s</b>	nd <sup>c</sup>
<b>H1II</b>	nd <sup>c</sup>	<b>H1II s</b>	nd <sup>c</sup>
<b>H2II</b>	nd <sup>c</sup>	<b>H2II s</b>	nd <sup>c</sup>

nd: no detectado. Distinto superíndice dentro de la misma columna fueron significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

### II.3.2 pH y acidez titulable

En la **Figura II.2** se observan los cambios en el pH durante la preparación y almacenamiento refrigerado de los yogures naturales y endulzados.



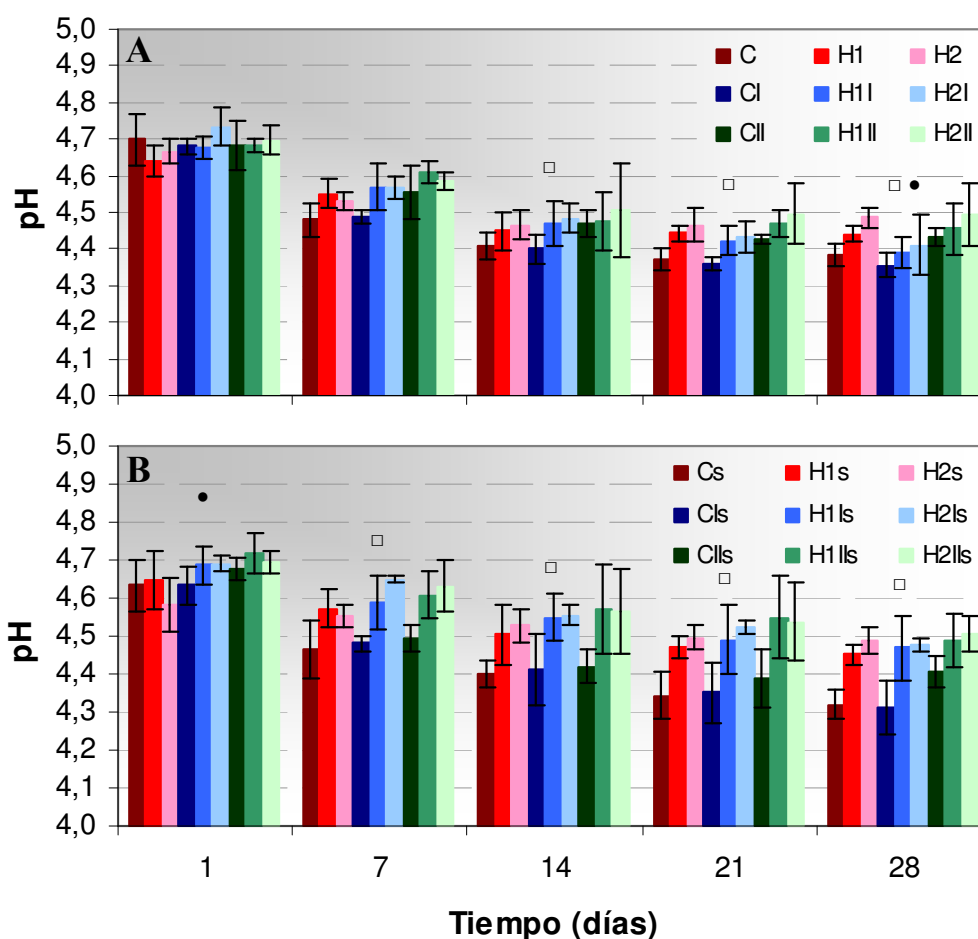
**Figura II. 2:** Evolución del pH de yogures naturales (A) y endulzados (B) con adición de diferentes niveles de enzima y de sólidos lácteos, durante la elaboración y el almacenamiento (5 °C/28 d).

Los símbolos correspondientes a cada tiempo analizado indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) para cada uno de los factores estudiados: adición de enzima ( $\square$ ) y agregado de sólidos lácteos ( $\bullet$ ).

Durante la elaboración la disminución más acentuada en el pH se observó desde los 45 min hasta el final del proceso, para los dos tipos de yogur. En los yogures naturales (A) no se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los hidrolizados y los controles para cada tiempo de muestreo. La adición de sólidos lácteos produjo una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) de pH en la leche y a los 45 y 150 min de elaboración; los valores en los productos sin adición de sólidos (bebibles) fueron mayores que en aquellos que tenían el nivel más alto de suplementación. Los yogures endulzados (B) siguieron un

comportamiento similar, con la diferencia de que a los 150 min de elaboración los controles presentaron menores valores de pH y los hidrolizados con el mayor nivel de sólidos tuvieron mayores pH ( $p < 0,05$ ).

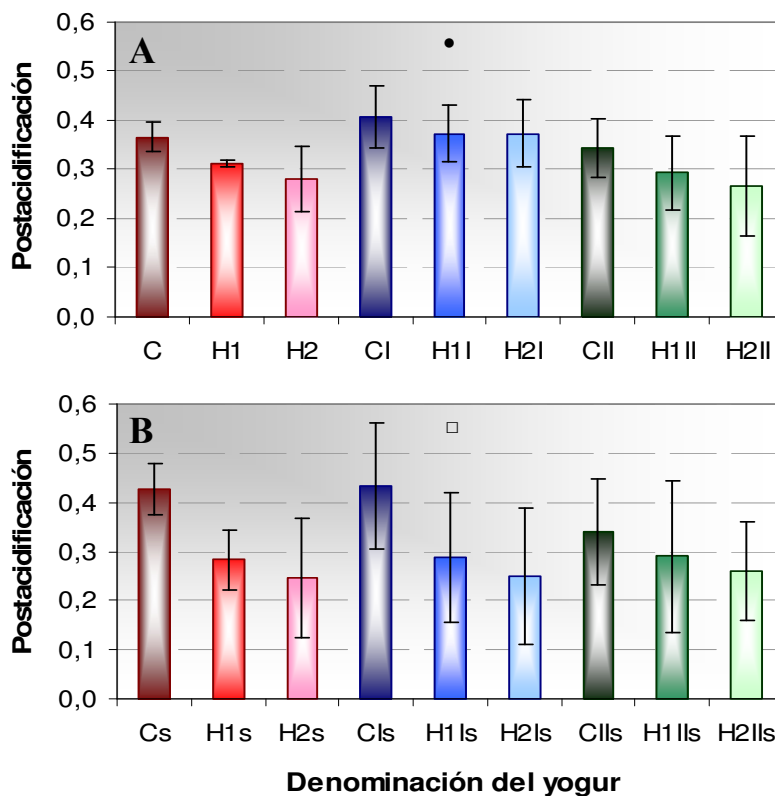
Durante el almacenamiento el pH de todos los yogures se unificaron entre 4 y 5 unidades. En la **Figura II.3** se observa en forma detallada esta evolución. El pH continuó descendiendo ligeramente hasta los 14 días y luego permaneció relativamente estable hasta los 28 días en todos los yogures. En los productos naturales (A) el efecto de la adición de la enzima fue significativo a los 14, 21 y 28 días, mientras que en los yogures con sacarosa (B) este efecto se evidenció a partir de los 7 días. Los yogures controles presentaron valores de pH significativamente menores ( $p < 0,05$ ) que los hidrolizados. La suplementación con sólidos lácteos no mostró variaciones importantes.



**Figura II. 3:** Evolución del pH de yogures naturales (A) y endulzados (B) con adición de diferentes niveles de enzima y de sólidos lácteos durante el almacenamiento (5 °C/28 d).

Los símbolos correspondientes a cada tiempo analizado indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) para cada uno de los factores estudiados: adición de enzima ( $\square$ ) y agregado de sólidos lácteos ( $\bullet$ ).

La postacidificación se define como la diferencia entre el valor de pH del yogur recién elaborado (F) y el pH del producto al final del almacenamiento (28 días). Los valores de postacidificación se muestran en la **Figura II.4**.

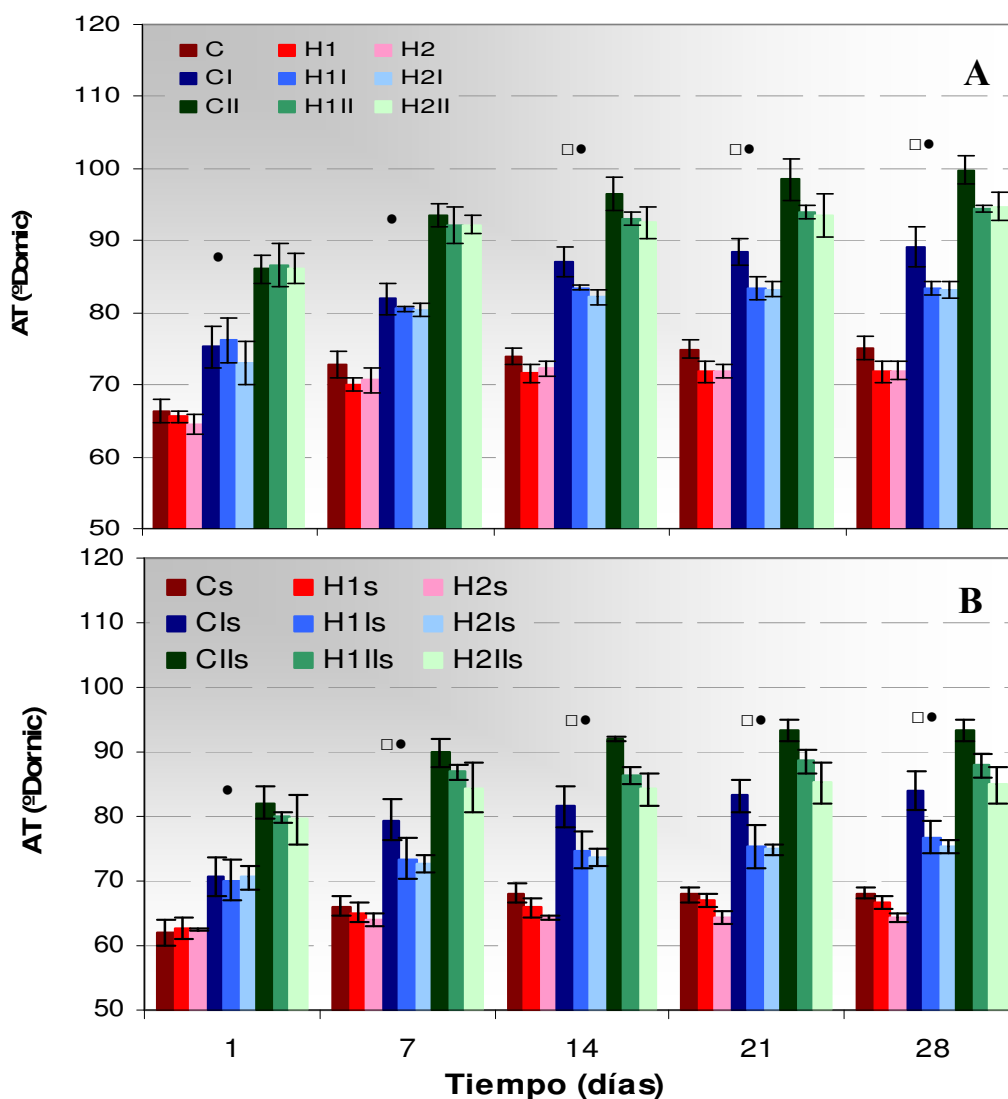


**Figura II. 4:** Postacidificación de yogures naturales (A) y endulzados (B) con adición de diferentes niveles de enzima y de sólidos lácteos.

Los símbolos indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) para cada uno de los factores estudiados: adición de enzima ( $\square$ ) y agregado de sólidos lácteos ( $\bullet$ ).

En los yogures naturales se observaron diferencias significativas en los valores de postacidificación con la adición de sólidos lácteos. Los yogures con sacarosa tuvieron un comportamiento distinto. Las diferencias encontradas fueron para los productos que tenían enzima, mientras que no se observaron diferencias entre los distintos niveles de sólidos lácteos. Los yogures hidrolizados presentaron menores valores de postacidificación ( $p < 0,05$ ) que sus respectivos controles.

Los cambios en la acidez titulable (AT) de los yogures durante el almacenamiento refrigerado a 5 °C por 28 días, se observa en la **Figura II.5**.



**Figura II. 5:** Acidez titulable (AT) de yogures naturales (A) y endulzados (B) con adición de diferentes niveles de enzima y de sólidos lácteos durante el almacenamiento (5 °C/28d).

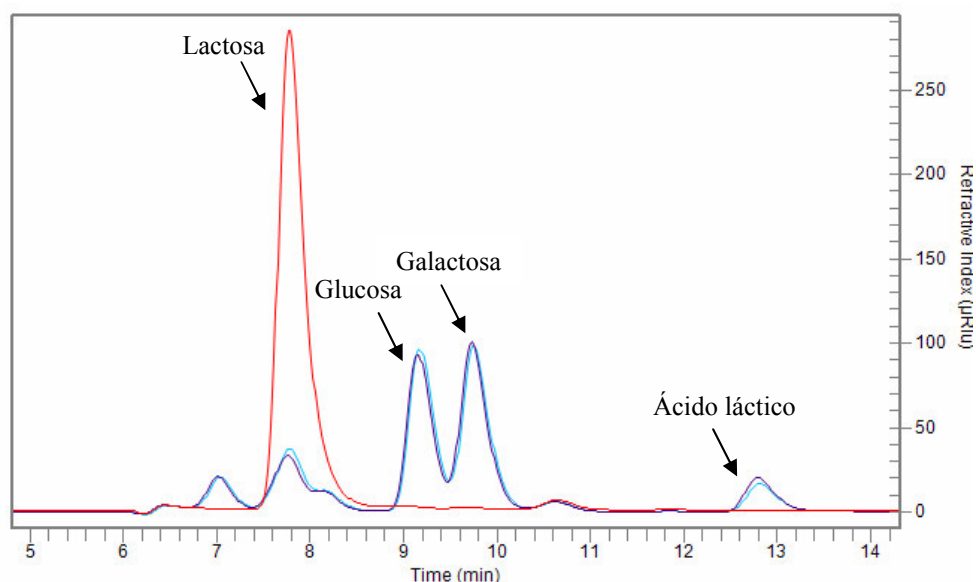
Los símbolos correspondientes a cada tiempo analizado indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) para cada uno de los factores estudiados: adición de enzima (□) y agregado de sólidos lácteos (●).

Los valores de acidez para todos los productos estuvieron entre 62,0 y 99,8 °D. Un incremento notorio se produjo a los primeros 7 días y luego se mantuvo relativamente constante hasta el final del almacenamiento. La influencia de la enzima  $\beta$ -galactosidasa fue significativa ( $p < 0,05$ ) a partir de los 14 días para los yogures naturales y de los 7 días para los endulzados, presentando los productos hidrolizados valores de acidez más bajos ( $p < 0,05$ ) en comparación a sus respectivos controles. Esta diferencia se acentuaría por la presencia de sacarosa en el medio. En efecto, los yogures naturales con diferentes dosis de enzima tuvieron similares valores de acidez ( $p > 0,05$ ), mientras que los yogures endulzados con la dosis más alta de enzima presentaron menor AT a los 21 y 28 días con respecto a los de menor dosis de enzima.

La AT aumentó significativamente ( $p < 0,05$ ) con la adición de cada nivel de sólidos lácteos en polvo, tanto para los yogures naturales como para los endulzados.

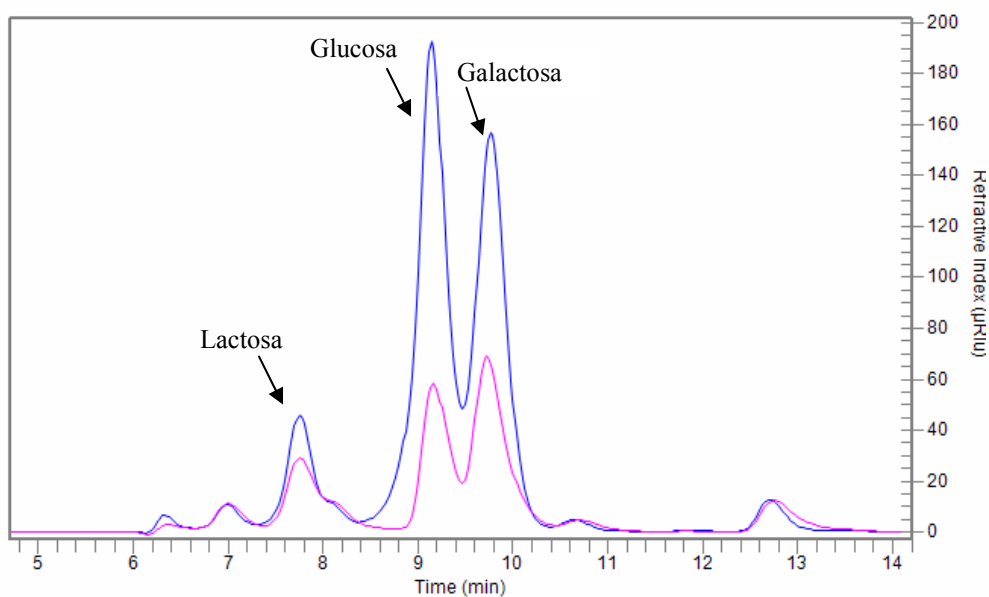
### II.3.3 Perfil de carbohidratos

En las Figuras II.6 y II.7 se observan, a modo de ejemplo, los perfiles cromatográficos de carbohidratos para varias muestras de yogur.



(—): Tiempo inicial (leche); (—): final de elaboración; (—): 28 días de almacenamiento.

**Figura II. 6:** Perfiles de carbohidratos de muestras de yogur natural batido (4,4%) hidrolizado (0,25 g/L) durante la elaboración y el almacenamiento (5 °C/28 d).

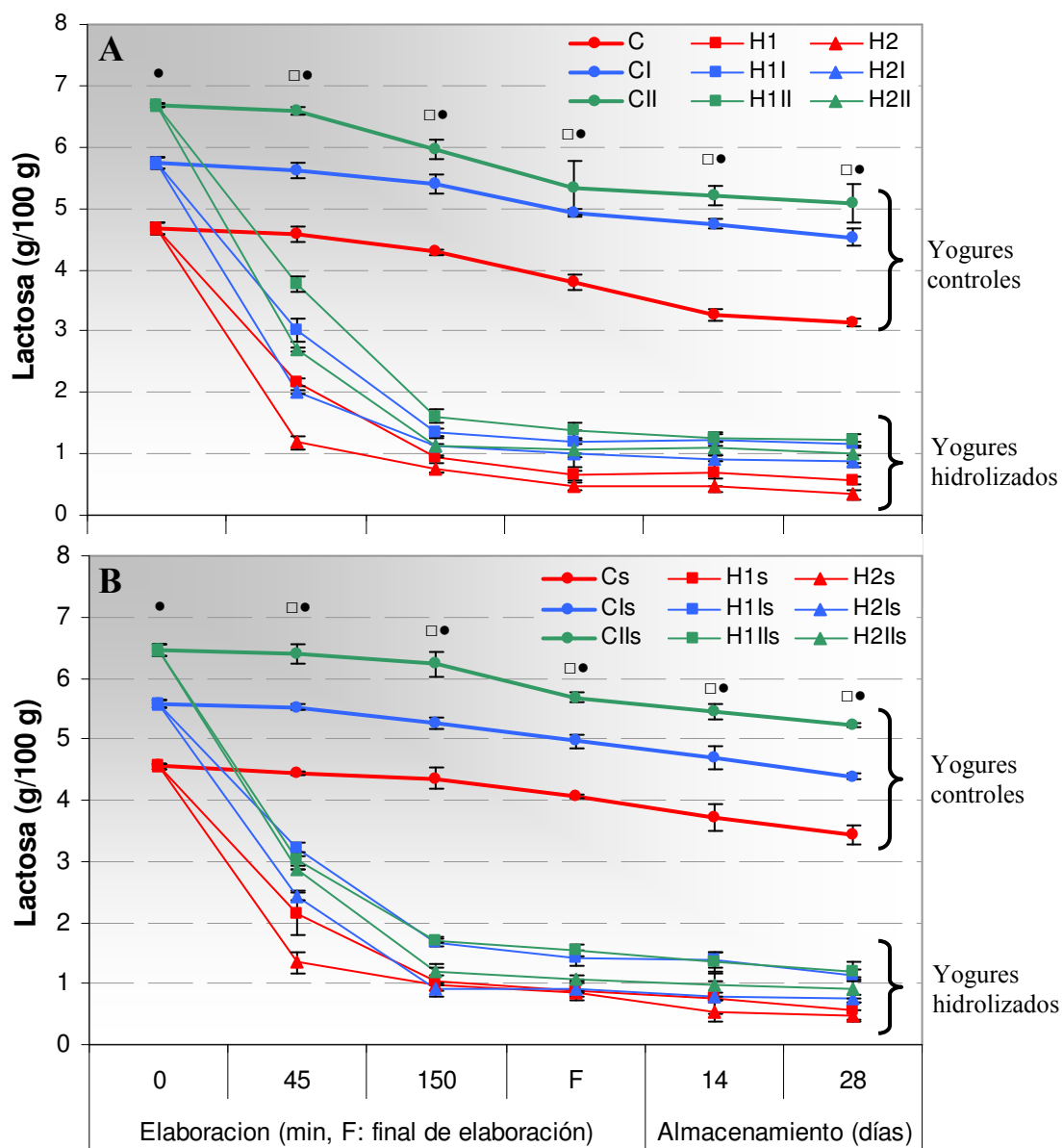


(—): yogur endulzado bebible hidrolizado (0,16 g/L); (—): yogur natural batido (4,4%) hidrolizado (0,25 g/L).

**Figura II. 7:** Perfiles de carbohidratos de diferentes yogures al final de la elaboración.

Como puede observarse en la **Figura II.7**, los picos de glucosa y galactosa en los yogures con sacarosa son muy elevados debido al problema de inversión que sufre este azúcar durante el análisis cromatográfico, tal como ha sido mencionado.

La evolución de la concentración de lactosa en los yogures naturales y endulzados durante la elaboración y almacenamiento refrigerado se muestra en la **Figura II.8**.



**Figura II. 8:** Concentraci3n de lactosa de yogures naturales (A) y endulzados (B) con adici3n de diferentes niveles de enzima y de s3lidos l3cteos durante la elaboraci3n y el almacenamiento (5 °C/28 d).

Los s3mbolos correspondientes a cada tiempo analizado indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) para cada uno de los factores estudiados: adici3n de enzima ( $\square$ ) y agregado de s3lidos l3cteos ( $\bullet$ ).

Los dos factores estudiados interaccionaron entre sí influyendo significativamente ( $p < 0,05$ ) sobre la concentración de lactosa durante la elaboración y el almacenamiento refrigerado de todos los yogures, tanto naturales como endulzados.

La concentración de lactosa en las muestras de leche aumentó significativamente ( $p < 0,05$ ) debido a la suplementación con los sólidos lácteos que aportaron lactosa a la leche base, desde  $4,67 \pm 0,09$  y  $4,56 \pm 0,04$  g/100 g en la leche sin agregado hasta  $6,68 \pm 0,04$  y  $6,46 \pm 0,10$  g/100 g en la leche con el mayor nivel de sólidos, para yogures naturales y endulzados, respectivamente.

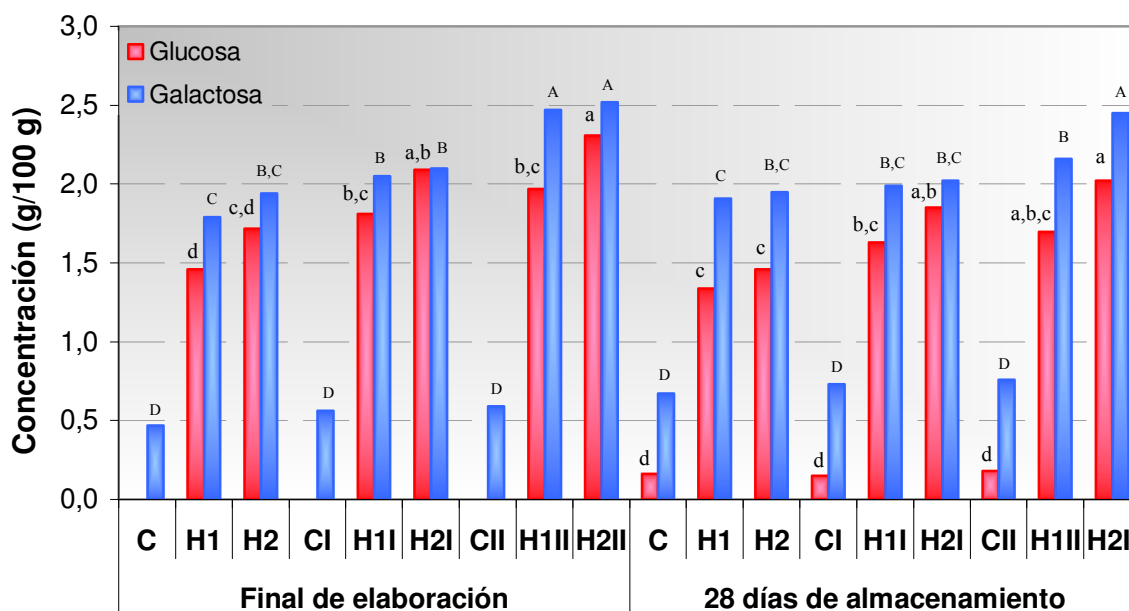
Los yogures hidrolizados naturales y endulzados experimentaron disminuciones significativas ( $p < 0,05$ ) en el contenido de lactosa en comparación a sus respectivos controles, a partir de los 45 min y hasta el final del almacenamiento. Diferencias significativas entre las dosis de enzima adicionadas se distinguieron sólo a los 45 min para los yogures naturales y a los 45, 150 min y final de elaboración para los productos endulzados, para al menos algún nivel de sólidos. La incorporación de sólidos fue evidente en todos los tiempos de muestreo, los yogures batidos con el mayor nivel de sólidos (H1II y H2II) tuvieron mayores concentraciones ( $p < 0,05$ ) de lactosa que los yogures bebibles (H1 y H2). Al final de la elaboración la disminución promedio de lactosa fue de aprox. 83 y 80% para los yogures naturales y endulzados, respectivamente, correspondiendo a concentraciones medias residuales de lactosa de  $0,96 \pm 0,34$  y  $1,12 \pm 0,30$  g/100 g, respectivamente. Durante el almacenamiento se observó una ligera disminución hasta los 28 días, alcanzando reducciones promedio de lactosa de aprox. 85% para las dos variedades de yogur, naturales y endulzados (valores medios de lactosa residual de  $0,86 \pm 0,34$  y  $0,84 \pm 0,30$  g/100 g, respectivamente).

Por el contrario, la evolución de la concentración de lactosa en los yogures controles fue muy diferente. Se observó un descenso progresivo durante la elaboración hasta aprox. 18 y 12% al final del proceso, para los productos naturales y endulzados, respectivamente. Luego, continuó disminuyendo hasta alcanzar porcentajes de 26 y 22% para ambos tipos de yogur, respectivamente. Los yogures con el mayor nivel de sólidos tuvieron concentraciones significativamente superiores ( $p < 0,05$ ) que los que tenían el nivel intermedio y que aquellos sin esta suplementación ( $CII > CI > C$  y  $CIIs > CIs > Cs$ ) para todos los tiempos analizados.

Los cambios observados para los monosacáridos glucosa y galactosa durante la elaboración y conservación de los yogures naturales se describen a continuación:



En las muestras de leche, las concentraciones de glucosa y galactosa fueron despreciables, ligeramente por encima del límite de detección (LD = 0,01 mg/mL). Sin embargo, la evolución de estos compuestos en los diferentes yogures recién elaborados y en los productos con 28 días se observa en la **Figura II.9**.



**Figura II. 9:** Concentración de glucosa y galactosa en los yogures naturales recién elaborados y con 28 días de almacenamiento (5 °C), con adición de diferentes niveles de enzima y de sólidos lácteos.

Letras minúsculas (glucosa) y mayúsculas (galactosa) diferentes en el mismo día de análisis indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

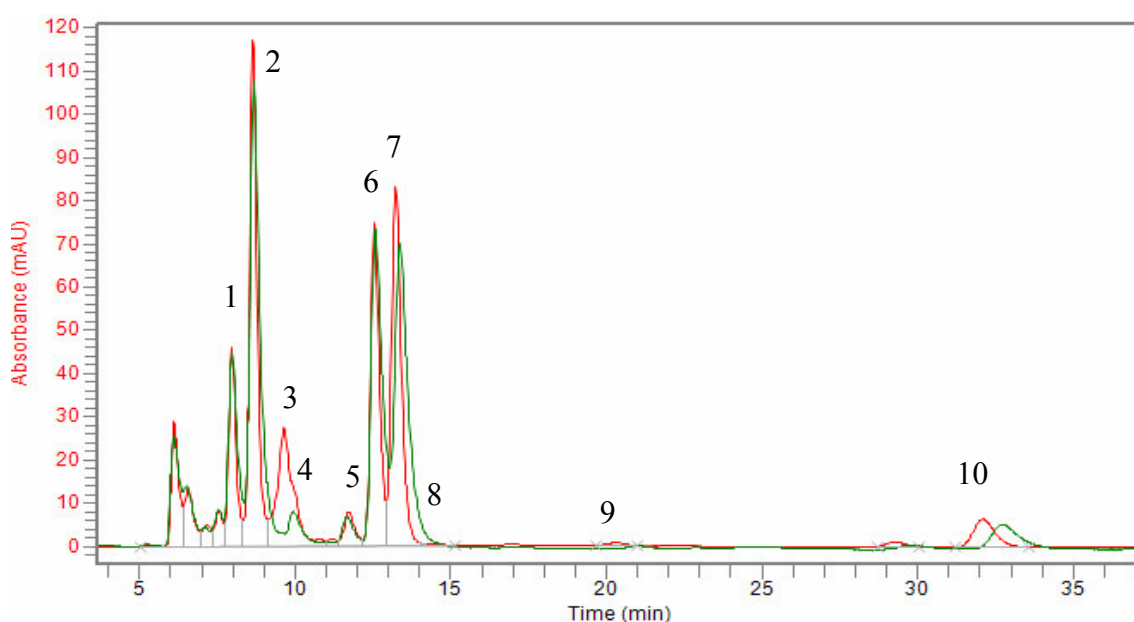
Se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) para la glucosa y la galactosa por la adición de enzima, presentando valores más altos los yogures hidrolizados comparados a los controles, pero no fue posible distinguir diferencias entre las dosis empleadas tanto al final de elaboración como a los 28 días. En los yogures hidrolizados, las concentraciones de glucosa y galactosa aumentaron considerablemente durante el proceso de elaboración (datos no mostrados), alcanzando valores medios de  $1,89 \pm 0,30$  y  $2,14 \pm 0,29$  g/100 g, respectivamente, al final del mismo. A los 28 días se observó una apreciable disminución en la glucosa (alrededor del 12%), mientras que la galactosa se mantuvo relativamente constante. En los yogures controles la glucosa se mantuvo invariable durante las 4 horas de fermentación y se encontró en niveles bajos de aprox. 0,16 g/100 g a los 28 días. La

concentración de galactosa fue de aprox. 0,54 g/100 g al final de la elaboración y aumentó ligeramente al final del almacenamiento hasta aprox. 0,72 g/100 g.

Los niveles de ambos monosacáridos se vieron afectados por la adición de sólidos, pero efectos significativos ( $p < 0,05$ ) sólo se encontraron para los yogures hidrolizados con el nivel más alto de sólidos (H1II, H2II) y aquellos sin este agregado (H1, H2).

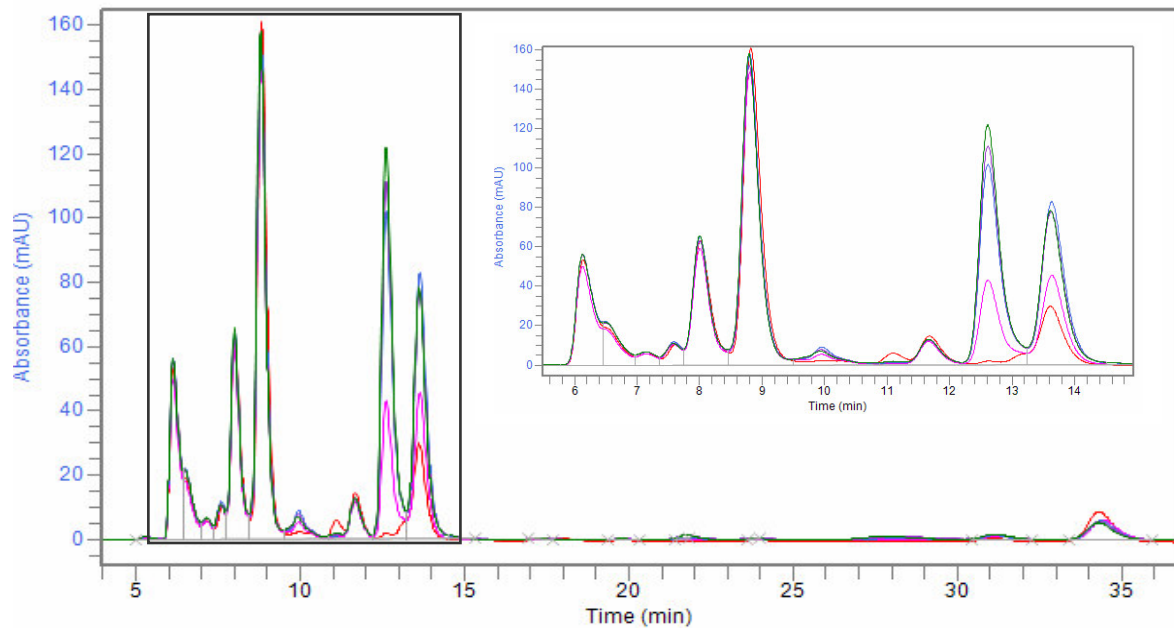
### II.3.4 Perfil de ácidos orgánicos

En las Figuras II.10 y II.11 se muestran, a modo de ejemplo, los perfiles de ácidos orgánicos de diferentes yogures.



(1) ácido cítrico; (2) ácido orótico; (3) fructosa proveniente de la inversión de la sacarosa; (4) ácido pirúvico; (5) no identificado; (6) ácido láctico y (7) ácido úrico y fórmico; (8) ácido acético; (9) ácido butírico; (10) ácido hipúrico. (—): yogur con sacarosa bebible hidrolizado (0,25 g/L); (—): yogur natural batido (4,4%) hidrolizado (0,25 g/L).

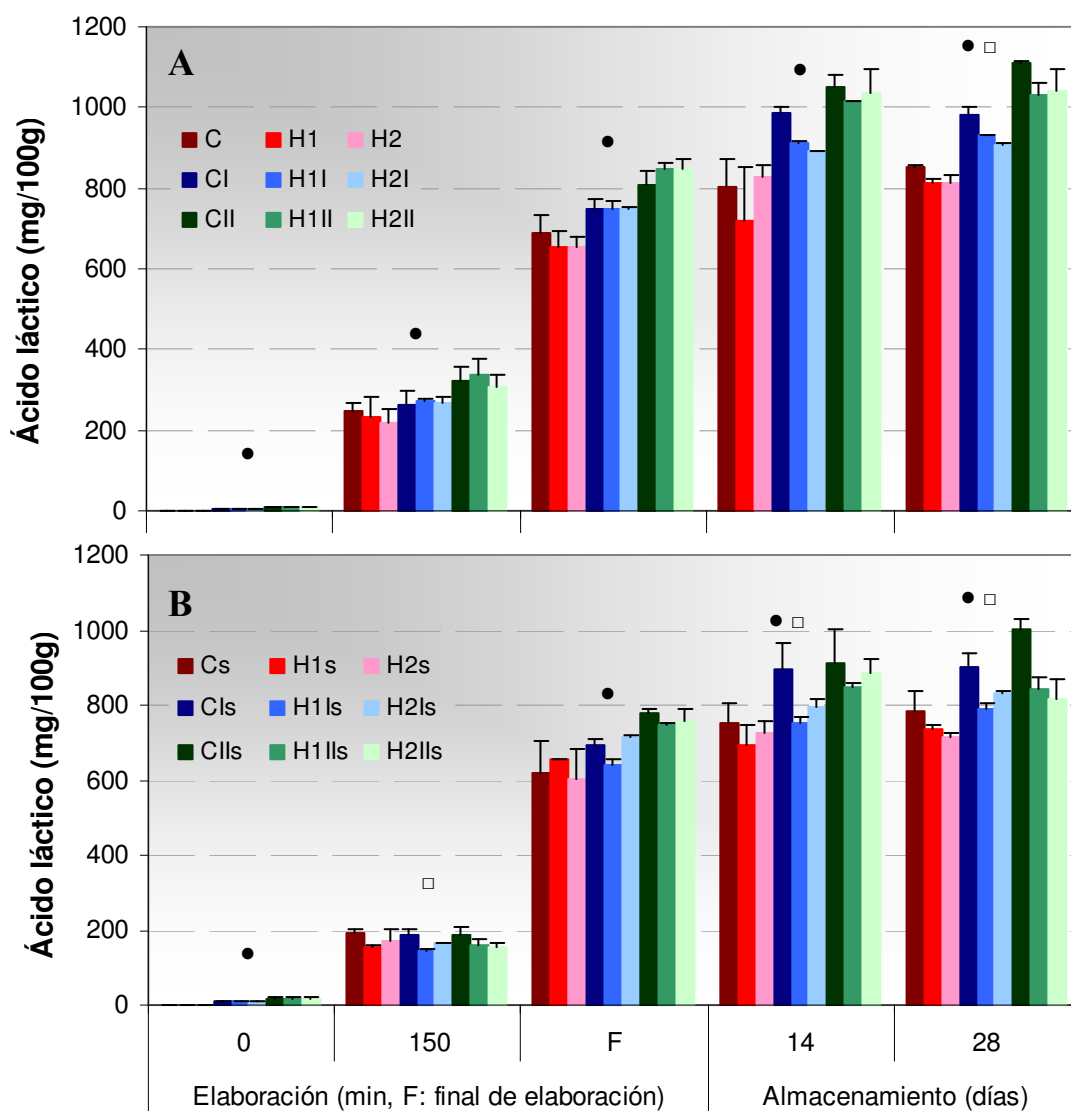
**Figura II. 10:** Perfiles de ácidos orgánicos de diferentes yogures al final de la elaboración.



(—) Tiempo inicial; (—) 150 min; (—) Final de elaboración; (—) 7 días; (—) 21 días.

**Figura II. 11:** Perfiles de ácidos orgánicos de muestras de yogur natural batido (4,4%) hidrolizado (0,25 g/L) durante la elaboración y el almacenamiento (5 °C).

En la **Figura II.12** se muestra la evolución de la concentración de ácido láctico durante la elaboración y almacenamiento en los yogures naturales y endulzados.



**Figura II. 12:** Concentración de ácido láctico de yogures naturales (A) y endulzados (B) durante la elaboración y el almacenamiento (5 °C/28 d).

Los símbolos correspondientes a cada tiempo analizado indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) para cada uno de los factores estudiados: adición de enzima (□) y agregado de sólidos lácteos (●).

El catabolismo de la lactosa por las bacterias que componen el starter de yogur se traduce principalmente en la producción de ácido láctico. En efecto, éste fue el principal ácido orgánico que se encontró, representando en los yogures recién elaborados, hidrolizados y controles, aproximadamente el 75,7% del contenido total de ácidos orgánicos detectados. En todos los productos, se produjo un fuerte aumento en la concentración de ácido láctico a partir de valores no detectados o muy bajos ( $< 20$  mg/100 g) en la leche hasta concentraciones medias de  $750 \pm 74$  y  $690 \pm 81$  mg/100 g a las 4 horas de fermentación en los yogures naturales y endulzados, respectivamente. Los valores

continuaron creciendo débilmente hacia los 28 días alcanzando concentraciones promedio de  $943 \pm 106$  y  $823 \pm 87$  mg/100 g para ambos tipos de yogur, respectivamente.

En los yogures naturales, la influencia de la adición de la enzima sobre la formación de ácido láctico sólo se encontró a los 28 días de almacenamiento. Los valores para los yogures hidrolizados con ambos niveles de enzima fueron significativamente menores ( $p < 0,05$ ), aproximadamente 6%, que los obtenidos para los controles. En cuanto a la adición de sólidos lácteos, se observaron diferencias significativas entre las muestras para todos los tiempos de muestreo. La concentración aumentó significativamente ( $p < 0,05$ ) con la adición de sólidos (CII, H1II, H2II > CI, H1I, H2I > C, H1, H2).

En el caso de los yogures endulzados, el comportamiento fue similar al observado para los productos naturales, aunque la influencia del agregado de enzima ya se hizo evidente durante la manufactura de los mismos. En efecto, los yogures hidrolizados tuvieron una concentración de ácido láctico significativamente menor ( $p < 0,05$ ) comparados a los controles a los 150 min de elaboración y a los 14 y 28 días de almacenamiento. A los 28 días la diferencia fue de aprox. 12%. La influencia de la suplementación con sólidos lácteos en la concentración de este ácido fue similar a la observada en los yogures naturales.

El contenido de ácido láctico durante el almacenamiento fue ligeramente más bajo en los yogures endulzados comparados a los naturales.

En la **Tabla II.5** se observan los resultados obtenidos para los ácidos acético, butírico, cítrico, hipúrico y orótico analizados en los yogures naturales y endulzados.

**Tabla II. 5:** Concentración de ácidos orgánicos (mg/100 g) de los yogures naturales y con sacarosa medidos durante la elaboración y almacenamiento refrigerado (5 °C/28 d).

Ácido orgánico	Nivel de sólidos lácteos (g/100 g)	Dosis de enzima (g/L)	Yogur natural					Yogur endulzado					
			Leche base	150 minutos	Final de la elaboración	14 días	28 días	Leche base	150 minutos	Final de la elaboración	14 días	28 días	
Acético	0,0	0,00	3,30 ± 0,14 <sup>b</sup>	5,14 ± 0,09	7,87 ± 1,00	7,82 ± 0,36 <sup>b</sup>	8,28 ± 0,40	3,40 ± 0,14 <sup>b</sup>	4,75 ± 0,10	6,87 ± 0,16	8,59 ± 0,27	8,08 ± 1,16	
		0,25		5,41 ± 0,89	7,45 ± 0,40	8,25 ± 1,51 <sup>b</sup>	8,58 ± 1,09	4,49 ± 0,71	6,80 ± 0,88	8,22 ± 0,76	7,05 ± 0,33		
		0,40		5,39 ± 0,01	7,17 ± 0,87	9,37 ± 0,02 <sup>b</sup>	8,36 ± 0,30	4,79 ± 0,44	6,11 ± 0,10	7,86 ± 0,13	6,37 ± 0,67		
	2,2	0,00	3,78 ± 0,14 <sup>a</sup>	4,53 ± 0,49	5,85 ± 0,11	8,33 ± 0,78 <sup>b</sup>	8,95 ± 0,18	3,31 ± 0,21 <sup>b</sup>	4,30 ± 0,71	6,61 ± 0,47	7,89 ± 0,80	7,65 ± 1,67	
		0,25		4,79 ± 0,71	7,37 ± 0,26	9,77 ± 0,73 <sup>b</sup>	8,36 ± 1,39	3,99 ± 0,15	6,32 ± 1,09	9,56 ± 1,03	8,21 ± 1,11		
		0,40		5,25 ± 0,08	7,01 ± 0,55	9,18 ± 0,59 <sup>b</sup>	9,08 ± 0,17	4,04 ± 0,08	6,27 ± 0,10	7,39 ± 0,25	8,35 ± 2,00		
	4,4	0,00	3,84 ± 0,07 <sup>a</sup>	5,28 ± 0,83	7,14 ± 1,03	9,93 ± 0,34 <sup>a</sup>	10,21 ± 0,51	3,79 ± 0,27 <sup>a</sup>	4,19 ± 0,28	6,88 ± 0,09	7,47 ± 2,09	8,00 ± 0,52	
		0,25		5,03 ± 0,20	7,86 ± 1,00	9,87 ± 0,22 <sup>a</sup>	8,83 ± 1,66	3,94 ± 0,21	6,24 ± 0,07	8,64 ± 0,76	10,41 ± 1,36		
		0,40		5,34 ± 0,08	6,96 ± 0,91	10,44 ± 0,2 <sup>a</sup>	9,20 ± 1,13	4,01 ± 0,24	5,89 ± 0,78	8,58 ± 0,25	8,91 ± 2,38		
	Butírico	0,0	0,00	nd	2,54 ± 0,50	11,88 ± 4,71 <sup>a</sup>	27,54 ± 3,20 <sup>a</sup>	34,41 ± 3,18 <sup>a</sup>	nd	0,99 ± 0,27	9,56 ± 3,91 <sup>a</sup>	20,68 ± 0,04 <sup>a</sup>	26,28 ± 8,21 <sup>a</sup>
			0,25		2,48 ± 0,41	10,98 ± 2,35 <sup>a</sup>	22,93 ± 0,74 <sup>a</sup>	25,30 ± 5,72 <sup>a</sup>	1,40 ± 0,56	12,01 ± 2,48 <sup>a</sup>	22,65 ± 3,41 <sup>a</sup>	25,55 ± 3,61 <sup>a</sup>	
			0,40		1,55 ± 0,77	10,65 ± 2,35 <sup>a</sup>	24,17 ± 6,51 <sup>a</sup>	21,36 ± 8,27 <sup>a</sup>	1,19 ± 0,27	9,29 ± 1,99 <sup>a</sup>	20,56 ± 3,71 <sup>a</sup>	20,28 ± 5,08 <sup>a</sup>	
2,2		0,00	0,80 ± 0,00 <sup>b</sup>	1,69 ± 0,85	8,00 ± 2,66 <sup>b</sup>	18,96 ± 3,08 <sup>b</sup>	19,53 ± 3,08 <sup>b</sup>	0,25 ± 0,21 <sup>b</sup>	1,00 ± 0,42	7,34 ± 0,53 <sup>b</sup>	16,51 ± 1,98 <sup>b</sup>	17,00 ± 2,70 <sup>b</sup>	
		0,25		1,45 ± 0,64	7,55 ± 2,67 <sup>b</sup>	16,45 ± 1,31 <sup>b</sup>	15,17 ± 1,44 <sup>b</sup>	1,10 ± 0,00	7,30 ± 1,15 <sup>b</sup>	14,23 ± 2,04 <sup>b</sup>	16,72 ± 2,12 <sup>b</sup>		
		0,40		2,00 ± 0,99	5,68 ± 1,01 <sup>b</sup>	16,45 ± 4,46 <sup>b</sup>	17,61 ± 2,81 <sup>b</sup>	2,64 ± 1,62	6,51 ± 2,28 <sup>b</sup>	11,26 ± 2,10 <sup>b</sup>	13,38 ± 0,71 <sup>b</sup>		
4,4		0,00	1,19 ± 0,16 <sup>a</sup>	1,84 ± 1,62	7,88 ± 1,25 <sup>b</sup>	19,64 ± 2,54 <sup>b</sup>	18,29 ± 4,06 <sup>b</sup>	1,54 ± 0,21 <sup>a</sup>	3,10 ± 1,56	7,86 ± 0,73 <sup>b</sup>	14,75 ± 3,37 <sup>b</sup>	17,24 ± 1,69 <sup>b</sup>	
		0,25		1,29 ± 0,43	5,56 ± 1,58 <sup>b</sup>	17,37 ± 3,81 <sup>b</sup>	17,01 ± 2,82 <sup>b</sup>	1,03 ± 0,33	6,69 ± 0,14 <sup>b</sup>	11,18 ± 1,67 <sup>b</sup>	9,91 ± 1,93 <sup>b</sup>		
		0,40		1,55 ± 0,64	8,67 ± 2,91 <sup>b</sup>	18,35 ± 5,53 <sup>b</sup>	17,41 ± 3,66 <sup>b</sup>	2,03 ± 2,06	6,68 ± 1,60 <sup>b</sup>	12,52 ± 2,51 <sup>b</sup>	11,08 ± 2,81 <sup>b</sup>		

<b>Cítrico</b>	<b>0,0</b>	<b>0,00</b>	176,91 ± 9,34 <sup>c</sup>	179,30 ± 5,74 <sup>c</sup>	183,47 ± 3,82 <sup>c</sup>	169,57 ± 24,03 <sup>c</sup>	183,08 ± 4,90 <sup>c</sup>	168,00 ± 3,22 <sup>c</sup>	165,32 ± 7,12 <sup>c</sup>	160,91 ± 12,51 <sup>c</sup>	160,53 ± 1,80 <sup>c</sup>	163,04 ± 2,58 <sup>c</sup>
		<b>0,25</b>		175,59 ± 6,84 <sup>c</sup>	174,49 ± 1,15 <sup>c</sup>	161,57 ± 1,67 <sup>c</sup>	171,90 ± 9,71 <sup>c</sup>		167,51 ± 5,71 <sup>c</sup>	167,06 ± 9,87 <sup>c</sup>	158,90 ± 7,27 <sup>c</sup>	161,40 ± 9,98 <sup>c</sup>
		<b>0,40</b>		181,14 ± 5,70 <sup>c</sup>	164,72 ± 14,13 <sup>c</sup>	177,47 ± 19,73 <sup>c</sup>	178,54 ± 14,45 <sup>c</sup>		168,07 ± 2,53 <sup>c</sup>	147,15 ± 5,21 <sup>c</sup>	162,22 ± 11,57 <sup>c</sup>	161,85 ± 13,67 <sup>c</sup>
	<b>2,2</b>	<b>0,00</b>	221,04 ± 1,36 <sup>b</sup>	218,68 ± 2,46 <sup>b</sup>	211,17 ± 0,92 <sup>b</sup>	216,15 ± 1,25 <sup>b</sup>	210,00 ± 0,40 <sup>b</sup>	199,65 ± 8,41 <sup>b</sup>	203,38 ± 10,53 <sup>b</sup>	203,71 ± 8,84 <sup>b</sup>	198,44 ± 4,02 <sup>b</sup>	194,17 ± 2,71 <sup>b</sup>
		<b>0,25</b>		220,82 ± 3,42 <sup>b</sup>	218,39 ± 5,36 <sup>b</sup>	212,91 ± 8,20 <sup>b</sup>	213,70 ± 1,10 <sup>b</sup>		198,37 ± 11,45 <sup>b</sup>	191,28 ± 19,49 <sup>b</sup>	195,96 ± 3,33 <sup>b</sup>	196,19 ± 1,22 <sup>b</sup>
		<b>0,40</b>		220,95 ± 1,68 <sup>b</sup>	219,05 ± 1,45 <sup>b</sup>	210,42 ± 2,32 <sup>b</sup>	203,62 ± 5,12 <sup>b</sup>		200,01 ± 3,16 <sup>b</sup>	202,73 ± 3,62 <sup>b</sup>	195,32 ± 3,77 <sup>b</sup>	195,66 ± 7,41 <sup>b</sup>
	<b>4,4</b>	<b>0,00</b>	250,64 ± 5,22 <sup>a</sup>	248,12 ± 3,82 <sup>a</sup>	234,65 ± 16,19 <sup>a</sup>	241,54 ± 8,02 <sup>a</sup>	249,14 ± 2,96 <sup>a</sup>	239,09 ± 3,00 <sup>a</sup>	232,74 ± 5,57 <sup>a</sup>	225,66 ± 1,06 <sup>a</sup>	223,04 ± 17,00 <sup>a</sup>	223,96 ± 1,12 <sup>a</sup>
		<b>0,25</b>		253,21 ± 3,78 <sup>a</sup>	254,59 ± 6,40 <sup>a</sup>	250,78 ± 4,81 <sup>a</sup>	249,38 ± 7,60 <sup>a</sup>		238,08 ± 3,92 <sup>a</sup>	232,09 ± 5,2 <sup>a</sup>	225,30 ± 0,76 <sup>a</sup>	220,93 ± 5,50 <sup>a</sup>
		<b>0,40</b>		254,95 ± 3,10 <sup>a</sup>	256,18 ± 4,22 <sup>a</sup>	251,07 ± 1,58 <sup>a</sup>	246,68 ± 0,9 <sup>a</sup>		237,20 ± 3,90 <sup>a</sup>	236,30 ± 10,76 <sup>a</sup>	233,10 ± 7,42 <sup>a</sup>	212,84 ± 16,30 <sup>a</sup>
<b>Hipúrico</b>	<b>0,0</b>	<b>0,00</b>	2,24 ± 0,01 <sup>c</sup>	2,06 ± 0,14 <sup>c</sup>	1,68 ± 0,10 <sup>c</sup>	1,21 ± 0,01 <sup>b</sup>	1,09 ± 0,18 <sup>c</sup>	2,05 ± 0,07 <sup>c</sup>	1,74 ± 0,02 <sup>c</sup>	1,57 ± 0,12 <sup>c</sup>	1,39 ± 0,22 <sup>c</sup>	1,27 ± 0,28 <sup>b</sup>
		<b>0,25</b>		1,86 ± 0,09 <sup>c</sup>	1,51 ± 0,15 <sup>c</sup>	1,17 ± 0,21 <sup>b</sup>	1,49 ± 0,14 <sup>c</sup>		1,89 ± 0,14 <sup>c</sup>	1,50 ± 0,03 <sup>c</sup>	1,25 ± 0,10 <sup>c</sup>	1,22 ± 0,09 <sup>b</sup>
		<b>0,4</b>		2,07 ± 0,08 <sup>c</sup>	1,63 ± 0,10 <sup>c</sup>	1,38 ± 0,05 <sup>a,b</sup>	1,17 ± 0,22 <sup>c</sup>		1,97 ± 0,08 <sup>c</sup>	1,30 ± 0,27 <sup>c</sup>	1,30 ± 0,10 <sup>c</sup>	1,14 ± 0,15 <sup>b</sup>
	<b>2,2</b>	<b>0,00</b>	2,79 ± 0,07 <sup>b</sup>	2,68 ± 0,08 <sup>b</sup>	2,04 ± 0,04 <sup>b</sup>	1,74 ± 0,11 <sup>a,b</sup>	1,53 ± 0,12 <sup>b</sup>	2,57 ± 0,18 <sup>b</sup>	2,44 ± 0,08 <sup>b</sup>	1,87 ± 0,03 <sup>b</sup>	1,61 ± 0,21 <sup>b</sup>	1,41 ± 0,34 <sup>b</sup>
		<b>0,25</b>		2,57 ± 0,27 <sup>b</sup>	2,02 ± 0,14 <sup>b</sup>	1,81 ± 0,05 <sup>a</sup>	1,62 ± 0,03 <sup>b</sup>		2,38 ± 0,19 <sup>b</sup>	1,99 ± 0,22 <sup>b</sup>	1,68 ± 0,11 <sup>b</sup>	1,45 ± 0,14 <sup>b</sup>
		<b>0,40</b>		2,64 ± 0,07 <sup>b</sup>	1,92 ± 0,09 <sup>b</sup>	1,66 ± 0,08 <sup>a,b</sup>	1,56 ± 0,08 <sup>b</sup>		2,51 ± 0,05 <sup>b</sup>	1,78 ± 0,03 <sup>b</sup>	1,63 ± 0,17 <sup>b</sup>	1,54 ± 0,11 <sup>b</sup>
	<b>4,4</b>	<b>0,00</b>	3,18 ± 0,14 <sup>a</sup>	2,83 ± 0,02 <sup>a</sup>	2,15 ± 0,08 <sup>a</sup>	1,92 ± 0,23 <sup>a</sup>	1,87 ± 0,26 <sup>a</sup>	2,99 ± 0,13 <sup>a</sup>	2,63 ± 0,33 <sup>a</sup>	2,24 ± 0,03 <sup>a</sup>	1,58 ± 0,24 <sup>a</sup>	1,61 ± 0,22 <sup>a</sup>
		<b>0,25</b>		2,80 ± 0,19 <sup>a</sup>	2,19 ± 0,21 <sup>a</sup>	1,95 ± 0,06 <sup>a</sup>	1,91 ± 0,12 <sup>a</sup>		2,97 ± 0,01 <sup>a</sup>	2,64 ± 0,05 <sup>a</sup>	2,31 ± 0,11 <sup>a</sup>	2,04 ± 0,20 <sup>a</sup>
		<b>0,40</b>		2,90 ± 0,24 <sup>a</sup>	2,18 ± 0,11 <sup>a</sup>	1,85 ± 0,15 <sup>a</sup>	1,74 ± 0,05 <sup>a</sup>		2,91 ± 0,22 <sup>a</sup>	2,58 ± 0,04 <sup>a</sup>	2,18 ± 0,06 <sup>a</sup>	1,72 ± 0,23 <sup>a</sup>
<b>Orótico</b>	<b>0,0</b>	<b>0,00</b>	8,65 ± 0,19 <sup>c</sup>	9,59 ± 0,29 <sup>c</sup>	9,41 ± 0,15 <sup>c</sup>	8,68 ± 1,36 <sup>c</sup>	9,45 ± 0,09 <sup>c</sup>	8,24 ± 0,48 <sup>c</sup>	9,00 ± 0,21 <sup>b</sup>	9,33 ± 0,22 <sup>c</sup>	8,89 ± 0,99 <sup>b</sup>	9,36 ± 0,49 <sup>c</sup>
		<b>0,25</b>		9,05 ± 0,46 <sup>c</sup>	8,70 ± 0,12 <sup>c</sup>	9,40 ± 0,08 <sup>c</sup>	9,18 ± 0,31 <sup>c</sup>		8,40 ± 0,47 <sup>b</sup>	8,87 ± 0,54 <sup>c</sup>	8,21 ± 0,89 <sup>b</sup>	8,94 ± 0,24 <sup>c</sup>
		<b>0,40</b>		9,09 ± 0,89 <sup>c</sup>	8,92 ± 0,29 <sup>c</sup>	9,47 ± 0,48 <sup>c</sup>	9,33 ± 0,32 <sup>c</sup>		8,79 ± 0,89 <sup>b</sup>	7,32 ± 1,63 <sup>c</sup>	9,07 ± 0,26 <sup>b</sup>	8,91 ± 0,43 <sup>c</sup>
	<b>2,2</b>	<b>0,00</b>	10,50 ± 0,27 <sup>b</sup>	10,94 ± 0,37 <sup>b</sup>	11,07 ± 0,30 <sup>b</sup>	11,08 ± 0,70 <sup>b</sup>	9,79 ± 0,81 <sup>b</sup>	9,96 ± 0,03 <sup>b</sup>	9,89 ± 0,55 <sup>b</sup>	10,49 ± 0,05 <sup>b</sup>	10,51 ± 0,00 <sup>a</sup>	10,05 ± 0,53 <sup>b</sup>
		<b>0,25</b>		10,83 ± 0,77 <sup>b</sup>	11,22 ± 0,34 <sup>b</sup>	11,09 ± 0,24 <sup>b</sup>	11,24 ± 0,46 <sup>b</sup>		9,14 ± 1,08 <sup>b</sup>	9,97 ± 0,58 <sup>b</sup>	10,03 ± 0,16 <sup>a</sup>	10,02 ± 0,03 <sup>b</sup>
		<b>0,40</b>		10,97 ± 0,28 <sup>b</sup>	10,87 ± 0,34 <sup>b</sup>	10,79 ± 0,33 <sup>b</sup>	10,46 ± 0,64 <sup>b</sup>		10,02 ± 0,21 <sup>b</sup>	10,41 ± 0,06 <sup>b</sup>	10,29 ± 0,53 <sup>a</sup>	10,30 ± 0,01 <sup>b</sup>
	<b>4,4</b>	<b>0,00</b>	12,13 ± 0,59 <sup>a</sup>	12,23 ± 0,26 <sup>a</sup>	11,92 ± 0,62 <sup>a</sup>	11,91 ± 0,00 <sup>a</sup>	12,19 ± 0,16 <sup>a</sup>	11,56 ± 0,56 <sup>a</sup>	11,06 ± 1,43 <sup>a</sup>	11,87 ± 0,18 <sup>a</sup>	10,32 ± 2,40 <sup>a</sup>	11,43 ± 0,51 <sup>a</sup>
		<b>0,25</b>		12,31 ± 0,14 <sup>a</sup>	12,11 ± 0,08 <sup>a</sup>	12,21 ± 0,33 <sup>a</sup>	12,24 ± 0,35 <sup>a</sup>		11,75 ± 0,30 <sup>a</sup>	12,03 ± 0,18 <sup>a</sup>	11,90 ± 0,31 <sup>a</sup>	11,59 ± 0,01 <sup>a</sup>
		<b>0,40</b>		12,18 ± 0,03 <sup>a</sup>	12,16 ± 0,07 <sup>a</sup>	12,25 ± 0,04 <sup>a</sup>	12,13 ± 0,05 <sup>a</sup>		11,46 ± 0,62 <sup>a</sup>	12,10 ± 0,11 <sup>a</sup>	11,99 ± 0,19 <sup>a</sup>	10,98 ± 1,28 <sup>a</sup>

nd: no detectado. Los valores con diferente superíndice dentro de la misma columna y ácido orgánico fueron significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Los mayores valores de concentración se encontraron para el ácido cítrico, seguido por los ácidos butírico, orótico, acético y hipúrico. A continuación se discuten los resultados obtenidos para cada ácido en particular:

**Ácido acético:** Los valores se incrementaron un 50% durante la elaboración en todos los yogures y luego siguieron aumentando ligeramente hasta el final del período de almacenamiento. No se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) por la adición de enzima. Sólo se observaron efectos significativos ( $p < 0,05$ ) por la incorporación de sólidos lácteos en las muestras de leche y en los yogures naturales a los 14 días de almacenamiento, teniendo mayores valores los productos con los niveles más altos de sólidos.

**Ácido cítrico:** Se mantuvo prácticamente sin cambios durante la elaboración y almacenamiento de los diferentes yogures. Los niveles fueron similares ( $p > 0,05$ ) entre los yogures hidrolizados y controles. La fortificación de la leche con polvos lácteos resultó en un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de este ácido.

**Ácido hipúrico:** Los valores disminuyeron alrededor del 30% durante la elaboración y se alcanzó una disminución de aprox. 50% al final del período de almacenamiento. El efecto de la adición de la enzima fue insignificante ( $p > 0,05$ ) en todos los tiempos de muestreo. Sin embargo, se observó un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) con la adición de sólidos; los valores fueron más altos para los yogures con el nivel II, valores intermedios para los productos con el nivel I y valores bajos para los yogures sin suplementación.

**Ácido butírico:** Se observó un aumento constante en la concentración para todos los yogures. En las muestras de leche, este ácido estuvo ausente o en baja concentración, pero los valores aumentaron bruscamente a partir de los 150 min hasta los 14 días y se mantuvieron casi sin cambios hasta el final. No se observó ningún efecto con respecto al factor enzima, pero se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) con la adición de sólidos lácteos. Los yogures sin sólidos lácteos tuvieron mayores concentraciones que los yogures suplementados.

**Ácido orótico:** Las concentraciones no se vieron afectadas por la adición de la enzima, pero fueron significativamente ( $p < 0,05$ ) influenciadas por la incorporación de sólidos, los valores aumentaron con el nivel de suplementación. Las concentraciones fueron similares en todos los yogures durante la elaboración y almacenamiento.



## **II.2 Discusión**

En este Capítulo se presentan los resultados obtenidos en las elaboraciones de yogures naturales y con sacarosa deslactosados por el empleo de diferentes dosis de enzima y partiendo de una matriz con contenido de lactosa variable por la adición de ingredientes lácteos en polvo en distintos niveles que se compararon con yogures sin adición de enzima y de polvos. Se analizó la influencia de los diferentes factores en el proceso de hidrólisis de la lactosa, mediante el análisis de los perfiles de azúcares y de ácidos orgánicos durante la elaboración y el almacenamiento refrigerado de los yogures, además se evaluó el pH, acidez titulable, sinéresis y composición química global.

En general, los yogures elaborados con el nivel intermedio de enzima (0,25 g/L) y de sólidos lácteos (LPD, WPC, pectina; 2,2%), presentaron un comportamiento intermedio entre aquellos elaborados con los niveles mínimos y máximos de ambos factores.

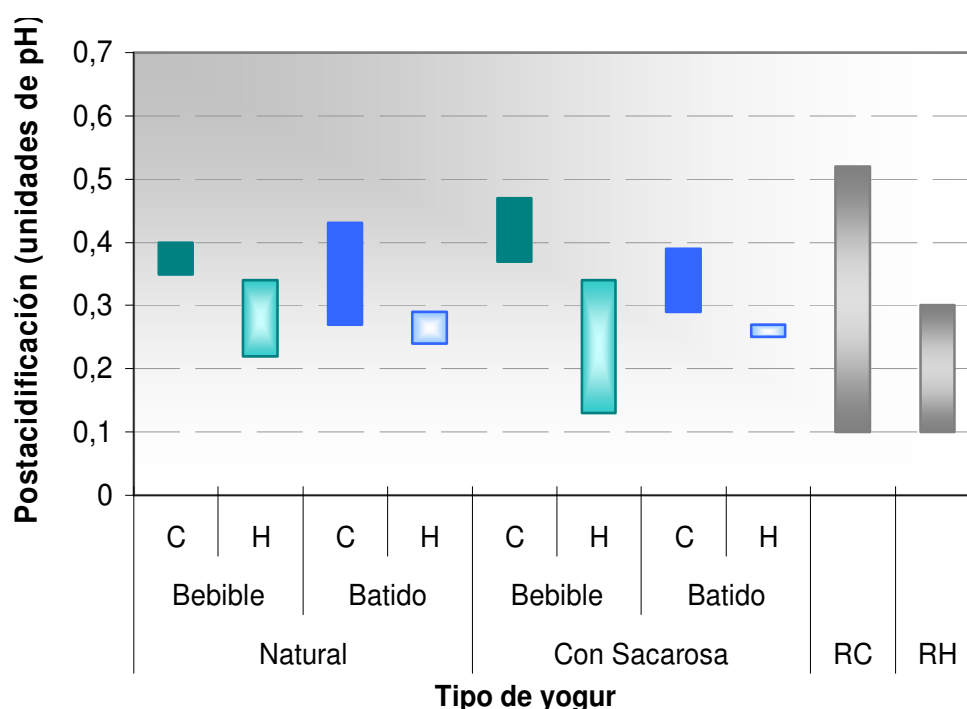
Los valores de composición global resultaron adecuados para cada tipo de producto. Los yogures cumplieron con los requerimientos de la Legislación Argentina (CAAa, 2010) en cuanto al contenido de proteína láctea (mínimo 2,9 g/100 g) y en relación al contenido de grasa se ubican en el límite superior del rango para la categoría de parcialmente descremados (0,6 a 2,9 g de materia grasa/100 g). Además, el CAA (CAAa, 2010) establece que las leches fermentadas con incorporación de sacarosa (entre otras sustancias) podrán tener contenidos de materia grasa y proteína inferiores a las mencionadas, no debiendo reducirse en una proporción mayor al porcentaje de la sustancia adicionada.

La sinéresis disminuyó principalmente con el agregado de sólidos de leche y en menor medida con la adición de sacarosa, lo cual no es sorprendente ya que la incorporación de sólidos (principalmente proteínas) es un método que se implementa para disminuir este defecto y además contribuye a la consistencia (Chandan y O'Rell, 2006b; Lee y Lucey, 2010). Mahdian y Tehrani (2007) elaboraron yogures con diferentes niveles de sólidos totales, desde 14 hasta 27% (obtenidos por concentración de la leche mediante evaporación a 55 °C/-0,8 bar), y obtuvieron valores de sinéresis que disminuyeron con el aumento de los mismos. La adición de enzima no modificó sustancialmente el porcentaje de sinéresis obtenido. Resultados contradictorios fueron obtenidos en este aspecto. Martins y col. (2012) no encontraron diferencias entre el yogur control e hidrolizado, mientras que Nagaraj y col. (2009) obtuvieron mayor sinéresis en el yogur hidrolizado y atribuyeron este fenómeno al mayor contenido de azúcares más solubles (glucosa y galactosa) y a una desestabilización de la caseína que condujo a un coágulo más débil.

El brusco descenso de pH a partir de los 45 min y hasta el final del proceso de elaboración está asociado a que los microorganismos se encuentran en la etapa de mayor desarrollo. En general, a los 150 min se observó la mayor variabilidad entre los diferentes productos, esto se debió a que no todos los yogures presentaron las mismas curvas de acidificación. En la mayoría de las experiencias realizadas los yogures hidrolizados demoraron entre 10 y 15 min más en alcanzar el pH de 4,7, lo que se acentuó aún más por la presencia de sacarosa. Similar observación fue reportada por Hernández y Vélez Ruiz (2010) e Ibarra y col. (2012) quienes informaron que el tiempo de fermentación de yogur realizado con leche hidrolizada, aumentaba a medida que incrementaban la dosis de enzima. Sin embargo estos resultados se contraponen con los alcanzados por Ismail y col. (1983) y Toba y col. (1986) quienes no encontraron diferencias en los tiempos de fermentación del yogur hidrolizado en comparación al tradicional, y con las obtenidas por Rodríguez y col. (2008), Nagaraj y col. (2009) y Martins y col. (2012) para los cuales el yogur hidrolizado presentó un menor tiempo de fermentación. Las hipótesis que se plantean para justificar las diferencias que se observan con respecto a los tiempos de fermentación son variables. Nagaraj y col. (2009) atribuyen este hecho a que en los yogures hidrolizados hay mayor cantidad de glucosa que es fácilmente fermentable por los microorganismos y por lo tanto se aceleraría el proceso de elaboración. Tamime y Robinson (1991) y Tossavainen y Kallioinen (2007b) plantean que algunas preparaciones comerciales de enzima tienen actividad proteolítica residual que contribuiría a liberar péptidos y aminoácidos al medio que podrían ser utilizados por los microorganismos y acelerar su actividad metabólica. Por otro lado, la utilización preferencial de lactosa podría deberse a limitaciones en el transporte de los monosacáridos hacia el interior celular. La presencia de una elevada cantidad de galactosa en el medio inhibe el metabolismo de la lactosa. Estudios bioquímicos han demostrado que la galactosa tiene una considerable afinidad por la enzima lactosa permeasa que es la implicada en uno de los dos sistemas de transporte de lactosa al interior de la célula (sistema transferasa y sistema permeasa), actuando como un inhibidor (Zourari y col., 1992).

Durante el almacenamiento los valores de pH descendieron ligeramente, alcanzando a los 28 días promedios de  $4,35 \pm 0,05$  y  $4,42 \pm 0,05$  para los yogures controles con N0 y NII de sólidos, respectivamente, y de  $4,49 \pm 0,03$  y  $4,50 \pm 0,04$  para los hidrolizados con N0 y NII de sólidos, respectivamente. Otra forma de expresar este hecho es a través de la postacidificación que se definió como un delta de pH. De manera de visualizar globalmente los valores obtenidos para los distintos yogures, se establecieron rangos a

partir de los valores individuales de las 3 réplicas de elaboración para los yogures naturales y con sacarosa hidrolizados tanto bebibles como batidos con el mayor nivel de enzima (H2, H2s) y de polvos (H2II, H2II<sub>s</sub>), y sus respectivos controles (C, Cs y CII, CII<sub>s</sub>) (**Fig. II.13**). En esta figura también se incluyeron valores reportados de bibliografía para yogures tradicionales y deslactosados que se expresaron como rangos.



**Figura II. 13:** Postacidificación de los yogures estudiados (28 d) y de bibliografía.

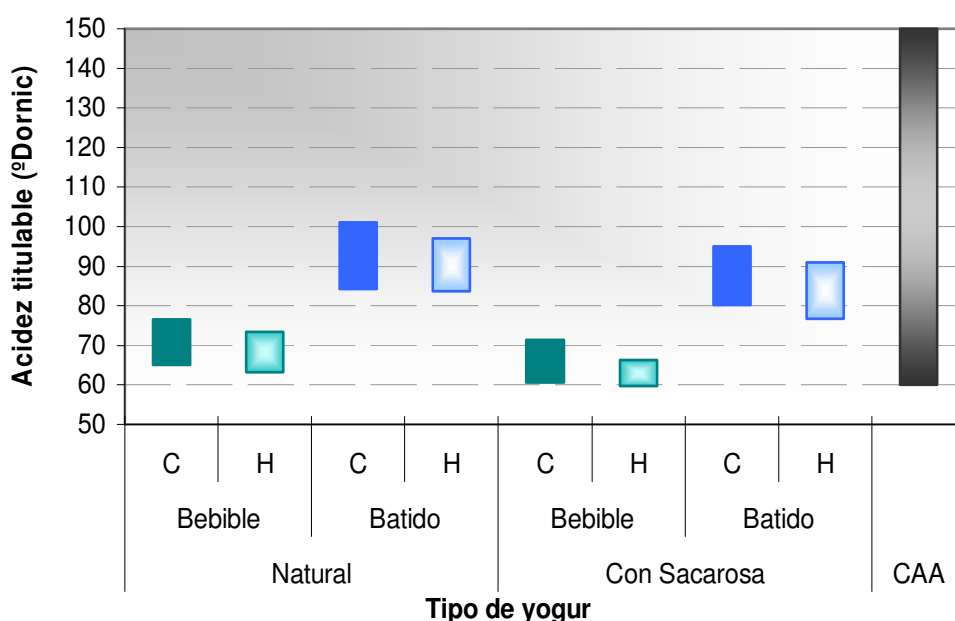
Valores para yogures batidos corresponden a los obtenidos para el mayor nivel de sólidos (4,4%). Valores para yogures hidrolizados corresponden a los obtenidos con el mayor nivel de enzima (0,40 g/L). C: control; H: hidrolizado; RC: valores reportados para yogur control; RH: valores reportados para yogur hidrolizado.

En particular, según datos del proveedor, las cepas que componen el cultivo starter empleado tienen la característica de presentar una baja postacidificación, condición importante dado que es un parámetro que limita la vida útil del yogur y la aceptación por parte de los consumidores (Gürakan y Altay, 2010).

Los valores para los controles (naturales y endulzados) oscilaron desde 0,27 hasta 0,48 unidades de pH. Birollo y col. (2000) encontraron valores de aprox. 0,2 unidades para yogures tradicionales almacenados por 60 días, y Kailasapathy (2006) informó valores de 0,52 unidades a los 28 días. En general, se observó menor postacidificación en los yogures hidrolizados, que se encontró entre 0,13 y 0,43 unidades. Similares resultados han sido

reportados por algunos autores. Ismail y col. (1983) informaron valores de 0,1 para yogures hidrolizados almacenados por 10 días que prácticamente no se diferenciaron de los controles respectivos. Toba y col. (1986) encontraron 0,3 unidades para yogures hidrolizados almacenados por 10 días, los que presentaron una leve disminución en la postacidificación (de hasta 0,06 unidades) en comparación a los controles.

En la **Figura II.14** se observan los rangos de valores de acidez titulable para los yogures estudiados, correspondiendo el menor valor al obtenido en el día 1 de almacenamiento y el mayor al día 28, a partir de los valores individuales de las tres réplicas de elaboración para los productos naturales y endulzados tanto bebibles como batidos, con el mayor nivel de enzima (H2, H2s) y de polvos (H2II, H2IIs), y sus respectivos controles (C, Cs y CII, CIIs). Los resultados se expresaron de esta manera para poder compararlos con los valores establecidos por el Código Alimentario Argentino, independientemente del tiempo de almacenamiento.



**Figura II. 14:** Rango de valores de acidez titulable de los yogures estudiados y del establecido por el CAA.

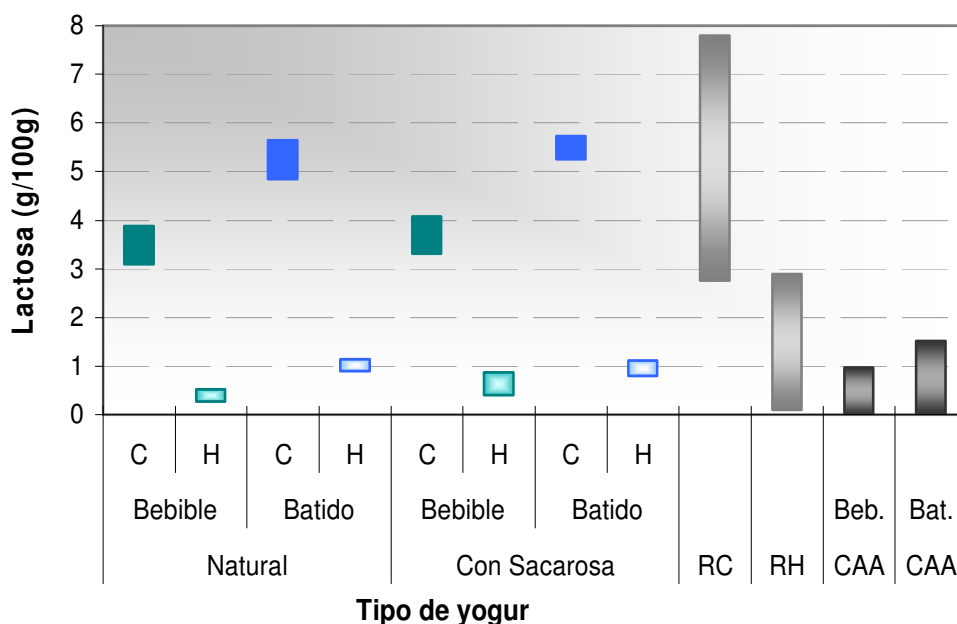
Los mínimos corresponden a los yogures frescos (día 1) y los máximos a los productos luego de 28 días de almacenamiento. Valores para yogures batidos corresponden a los obtenidos para el mayor nivel de sólidos (4,4%). Valores para yogures hidrolizados corresponden a los obtenidos con el mayor nivel de enzima (0,40 g/L). C: control; H: hidrolizado; CAA: rango de valores establecidos por el Código Alimentario Argentino.

En todos los casos los resultados obtenidos se encontraron comprendidos dentro del rango de valores establecido por el CAA: 60 – 150 °D (CAAa, 2010). Pueden distinguirse claramente dos grupos: los productos que presentaron valores más bajos que corresponden a los yogures tipo bebible y los que tuvieron mayor acidez que corresponden a los yogures tipo batido. Estos resultados se deben a que al adicionar sólidos lácteos a la leche base para preparar yogur tipo batido, aumenta el contenido de proteínas, fosfatos, citratos, lactatos y otros constituyentes de la leche que incrementan la capacidad buffer (Tamime y Robinson, 2007). Toba y col. (1986) informaron valores de acidez titulable de 118 y 94 °D en yogures hidrolizados preparados con dos enzimas diferentes, mientras que los respectivos controles tuvieron 133 y 124 °D, respectivamente. También se apreció que los yogures con sacarosa tuvieron valores ligeramente menores que los naturales. Similares observaciones fueron encontradas por Slocum y col. (1987), quienes sugirieron que la presencia de este azúcar podría inhibir el desarrollo de las bacterias probablemente debido al aumento en la presión osmótica y a una baja actividad de agua (Bills y col., 1972; Tamime y Robinson, 2007; Kim y col., 2009).

En general, durante el almacenamiento se observó un menor desarrollo de acidez titulable (o dicho de otra manera, una disminución de pH menos acentuada) y en consecuencia menor postacidificación, en los productos hidrolizados comparados a los controles. Este hecho indicaría que la actividad metabólica de los microorganismos del starter se modifica en presencia de un perfil de hidratos de carbono diferente. En efecto, O'Leary y Woychik (1976) y Amoroso y col. (1989) encontraron diferencias significativas en la viabilidad de cultivos puros y mixtos de *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* y *S. salivarius* ssp. *thermophilus* incubados en medios con distintos carbohidratos (glucosa, galactosa, lactosa y sacarosa). Hickey y col. (1986) hallaron que la adición de glucosa y galactosa a células *L. helveticus* crecidas en un medio de cultivo conteniendo lactosa, causó una represión de la síntesis de  $\beta$ -galactosidasa. Además, otros trabajos reportaron que el efecto de diferentes carbohidratos (glucosa, lactosa, sacarosa) sobre la viabilidad de los microorganismos es cepa dependiente (Slocum y col., 1987; Kim y col., 2009; Sobowale y col., 2011; Oliveira y col., 2012).

Los cambios más profundos en la concentración de lactosa debido a la presencia de la enzima exógena se observaron principalmente durante la fermentación. Por otra parte, en la **Figura II.12** se graficaron los rangos de concentración de lactosa residual de los diferentes yogures, correspondiendo el mayor valor al obtenido al finalizar el proceso de elaboración (F) y el menor al día 28, a partir de los valores individuales de las tres réplicas de

elaboración para los productos naturales y endulzados tanto bebibles como batidos con el mayor nivel de enzima (H2, H2s) y de polvos (H2II, H2IIs), y sus respectivos controles (C, Cs y CII, CIIs). También se incluyen valores reportados en bibliografía para yogures hidrolizados y tradicionales que se expresaron como rangos, y valores calculados de acuerdo a lo establecido por el CAA (se obtuvieron disminuyendo la concentración de los yogures controles en un 70%) (CAAb, 2013).



**Figura II. 15:** Rango de concentración de lactosa de los yogures estudiados, de valores de bibliografía y de los establecidos por el CAA.

En los yogures estudiados, los máximos valores corresponden al producto recién elaborado y los mínimos a los productos luego de 28 días de almacenamiento. Valores para yogures batidos corresponden a los obtenidos para el mayor nivel de sólidos (4,4%). Valores para yogures hidrolizados corresponden a los obtenidos con el mayor nivel de enzima (0,40 g/L). C: control; H: hidrolizado; RC: valores reportados para yogur control; RH: valores reportados para yogur hidrolizado.

Como puede observarse, se evidencian cuatro grupos bien definidos:

- Hidrolizados tipo bebibles que presentaron muy bajas concentraciones de lactosa, desde 0,28 hasta 0,87 g/100 g (que correspondió a porcentajes de hidrólisis de 94 y 81%, respectivamente).
- Hidrolizados tipo batidos (con NII de sólidos lácteos) con valores ligeramente superiores, desde 0,80 hasta 1,14 g/100 g (que correspondió a porcentajes de hidrólisis de 88 y 83%, respectivamente).

- Controles tipo bebibles con valores intermedios, de 3,10 a 4,08 g/100 g (que correspondió a porcentajes de reducción de lactosa de 34 y 11%, respectivamente).
- Controles tipo batidos que tuvieron los mayores valores, de 4,85 a 5,73 g/100 g (que correspondió a porcentajes de reducción de 28 y 10%, respectivamente).

El aumento significativo en la concentración de lactosa en las muestras debido a la suplementación con los ingredientes lácteos en polvo no es sorprendente, ya que estos productos proporcionan lactosa en cantidades diferentes a la matriz (LDP: 52,3 g/100 g; WPC 35%: 51,0 g/100 g) (Chandan y O'Rell, 2006b).

Como es bien conocido, los cambios observados en el contenido de lactosa de los yogures controles es debido a la actividad metabólica de los microorganismos del starter, quienes utilizan la lactosa como fuente de energía para sus procesos metabólicos (Takano y Yamamoto, 2011).

Tanto los yogures hidrolizados como los controles presentaron valores acorde a los reportados por otros autores. Como se mencionó, la información disponible sobre yogur delactosado obtenido por hidrólisis enzimática es escasa e incluso los niveles de lactosa informados presentan mucha variabilidad que depende del tipo y dosis de la enzima utilizada y de las condiciones de proceso empleadas en la elaboración. En efecto, Ismail y col. (1983) informaron valores de lactosa desde 1,83 hasta 2,93 g/100 mL en yogures hidrolizados recién elaborados con diferentes dosis de las enzimas Maxilact y Lactozym, en comparación a 3,55 g/100 mL en el control. Por su parte, Toba y col. (1986) obtuvieron porcentajes de lactosa luego de aprox. 8 h de fermentación que variaron de 0,2 a 2,5% para el nivel más alto y más bajo de enzima, respectivamente, con respecto a 4,5% en el control. Estos autores evidenciaron que la hidrólisis de lactosa continuó a lo largo del almacenamiento hasta alcanzar niveles de 0,1 a 0,7% a los 20 días, debido a que la enzima empleada tenía un pH óptimo de actividad de 4,5. Más recientemente, Martins y col. (2012) partiendo de una concentración inicial de lactosa de 9,1 g/100 mL y empleando una mezcla de enzimas provenientes de *K. lactis* y *A. niger*, obtuvieron un yogur hidrolizado con 0,19 g/100 mL de lactosa en comparación a 7,8 g/100 mL en el control.

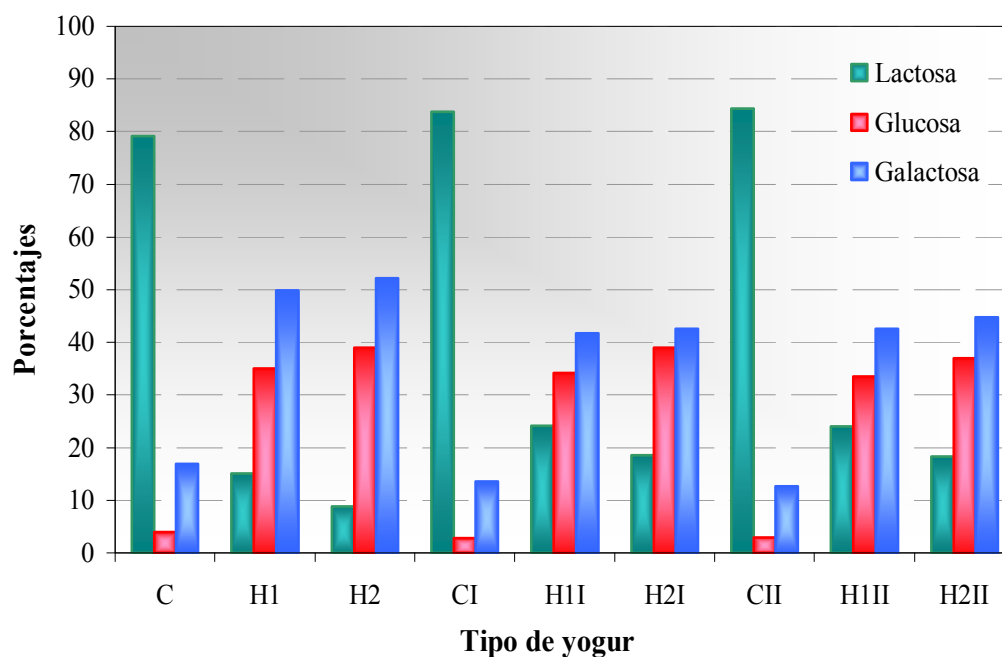
Con respecto a los monosacáridos glucosa y galactosa que fueron analizados sólo en los productos naturales, las elevadas concentraciones encontradas en los yogures hidrolizados al final de la elaboración y hasta los 28 días se debió principalmente a la incorporación de la enzima exógena y en menor medida a la actividad metabólica de los microorganismos del starter. Durante el proceso de fermentación, la lactosa ingresa al interior de la célula y se hidroliza a glucosa y galactosa por la enzima  $\beta$ -galactosidasa. La mayoría de las cepas

son capaces de metabolizar la glucosa a ácido láctico, pero no sucede lo mismo con la galactosa que, en general, es excretada de la célula y se acumula en el medio (Gürakan y Altay, 2010; Robinson, 2011). Por este motivo, en los yogures controles, la galactosa se detectó desde el final de la elaboración y aumentó ligeramente hacia los 28 días, mientras que la glucosa fue encontrada en bajos niveles sólo al final del período de conservación.

El comportamiento de estos monosacáridos fue similar a los reportados por otros autores. Los niveles de galactosa obtenidos por Ismail y col. (1983) estuvieron entre 1,98 y 2,75 g/100 mL en yogur hidrolizado en comparación con valores de 1,59 g/100 mL para yogures controles. Toba y col. (1986) encontraron valores de glucosa y galactosa para yogures hidrolizados desde 1,2 hasta 3,0 y desde 1,6 hasta 3,8 g/100 mL, respectivamente, mientras que en los controles no detectaron glucosa y la concentración de galactosa fue de 1,3 g/100 mL.

En resumen, el perfil de carbohidratos fue muy diferente en los yogures hidrolizados en comparación a los controles, hecho que se manifiesta desde el principio de la elaboración, debido a la mayor disponibilidad de lactosa (a través de la suplementación con sólidos lácteos) y a la inclusión de la enzima  $\beta$ -galactosidasa. En efecto, la disminución en el contenido de lactosa que se observó durante la elaboración principalmente en los yogures hidrolizados, produjo un aumento en el contenido de la glucosa y galactosa. Las proporciones medias de lactosa: glucosa: galactosa en relación con los azúcares totales fueron de 18:36:46 en los yogures hidrolizados, mientras que en los controles fueron de 81:4:15, a los 28 días de almacenamiento (**Fig. II.16**). Este hecho podría afectar la actividad metabólica del cultivo starter, tal como se observó en la acidez y en la producción de ácidos orgánicos.





**Figura II. 16:** Proporción relativa de lactosa, glucosa y galactosa en relación al total de carbohidratos en los yogures naturales controles e hidrolizados a los 28 días de almacenamiento (5 °C).

De acuerdo a nuestros resultados, la inclusión de la enzima  $\beta$ -galactosidasa sólo influyó la producción de ácido láctico en algunos tiempos de muestreo, principalmente en los yogures endulzados, con niveles más bajos en los productos hidrolizados en comparación a los controles. Como se mencionó anteriormente los diferentes azúcares presentes podrían haber afectado la actividad acidificante del cultivo starter y por lo tanto la formación de ácido láctico. Asimismo, se apreció un aumento en su concentración por la adición de sólidos, tanto en los hidrolizados como en los controles, lo que podría deberse al mayor contenido de lactosa, principal precursor de ácido láctico. Estos ingredientes también proporcionan péptidos y aminoácidos libres que pueden ser favorables para el crecimiento y actividad metabólica de los microorganismos (Sodini y col., 2002; McComas y Gilliland, 2003; Lucas y col., 2004). En este sentido, Amatayakul y col. (2006) encontraron niveles de ácido láctico más elevados en yogures con 14% de ST preparados a partir de una leche base que contenía mayor proporción de lactosa y otros nutrientes en comparación a yogures con 9% de ST, 1250 y 930 mg/100 g, respectivamente.

Varios trabajos han reportado perfiles de ácidos orgánicos en yogures con diferentes formulaciones con el fin de evaluar las actividades metabólicas del cultivo starter y

también de bacterias probióticas si las hubiere (Oliveira y col., 2012; Donkor y col., 2006), sin embargo, según nuestro conocimiento, no hay trabajos que informen la evolución de ácidos orgánicos en yogures hidrolizados.

Los valores informados en productos tradicionales son muy variables. En efecto, en yogures naturales recién elaborados con 13% de sólidos totales (ST) (obtenido por adición de LPD) se encontraron valores de 965 mg/100 g (Fernández-García y McGregor, 1994) y con 15% de ST (obtenido por reconstitución de LPD) valores de 589 mg/100 g (Adhikari y col., 2002), los que se incrementaron hasta 1100 mg/100 g a los 28 días y 631 mg/100 g a los 30 días de almacenamiento, respectivamente. A su vez, La Torre y col. (2003) observaron niveles de alrededor de 1140 mg/100 g en yogures recién preparados conteniendo 13% de ST (obtenido por reconstitución de LPD), los cuales se mantuvieron constantes durante 20 días. Ekinci y Gurel (2008) informaron un mayor contenido de alrededor de 2000 mg/100 g a los 7 días en yogures con 15% de ST (a partir de la fortificación de la leche de partida con LPD). Por el contrario, en yogures elaborados con inclusión de LPD para conseguir 15% de ST, Cruz y col. (2012a) encontraron niveles bajos de 316 mg/100 mL a los 15 días, y Cruz y col. (2013) reportaron 130 mg/100 mL al primer día de elaboración que se incrementó a 300 mg/100 mL a los 28 días.

Las concentraciones de los restantes ácidos (acético, butírico, cítrico, hipúrico y orótico) no fueron afectadas por la adición de enzima y en general la adición de LPD y WPC produjo un aumento, debido a que muchos de ellos están naturalmente presentes en la leche.

El ácido acético ha mostrado un importante incremento durante la elaboración y en menor medida durante el almacenamiento. Observaciones similares fueron realizadas por Fernández-García y McGregor (1994), Adhikari y col. (2002) y La Torre y col. (2003). Este ácido es el que menos modificación experimentó por la incorporación sólidos lácteos.

Los valores de ácido cítrico coincidieron con los reportados por Ekinci y Gurel (2008) que fueron de 256 mg/100 g a los 15 días de almacenamiento. Sin embargo, otros autores han encontrado concentraciones más bajas, como por ejemplo La Torre y col. (2003) obtuvieron valores de aprox. 80 mg/100 g en yogures recién elaborados.

En cuanto al comportamiento del ácido hipúrico, varios trabajos informan disminuciones en su concentración durante la elaboración y almacenamiento. Fernández-García y McGregor (1994) observaron una acentuada disminución desde 2,01 en la leche hasta 0,13 mg/100 g a las 4 h de fermentación. Resultados similares fueron obtenidos por Güzel-Seydim y col. (2000) en kéfir durante 5 h de fermentación. En efecto, se ha

demostrado que las bacterias ácido lácticas pueden convertir el ácido hipúrico, presente de forma natural en la leche, en ácido benzoico, que puede actuar como conservante y por lo tanto mejorar la vida útil de los alimentos (Fernández-García y McGregor, 1994; Sieber y col., 1995). Sin embargo, el ácido benzoico no fue analizado en esta tesis. La Torre y col. (2003) encontraron valores de 3 mg/100 g en leches fermentadas recién elaboradas empleando siete diferentes cultivos starter y probióticos; solamente uno de estos cultivos compuesto por *L. acidophilus*, *B. bifidum* y *S. thermophilus*, fue capaz de utilizar el ácido hipúrico y alcanzó valores de 0,1 mg/100 g a los 20 días.

El principal aumento que presentó el ácido butírico fue desde los 150 min de elaboración hasta los 14 días, además los yogures con presencia de sólidos lácteos tuvieron valores más bajos. Este ácido se produce a partir de la grasa de la leche que estaba presente en concentraciones relativamente más bajas en los yogures batidos. En este sentido, es importante tener en cuenta que la adición de LPD y WPC produce un aumento en los sólidos totales pero no modifica el contenido total de grasa de los yogures. Los valores publicados para el ácido butírico son muy variables entre los diferentes autores. Adhikari (2002) encontraron valores de aproximadamente 200 mg/100 g para yogures con 7 días de almacenamiento, mientras que Güler y Park (2011) reportaron un rango desde 3,6 a 14,7 µg/100 g en diferentes yogures comerciales tipo set.

Las concentraciones de ácido orótico aumentaron con el nivel de sólidos lácteos debido a que es un componente natural de la leche. Su contenido es más elevado en leches de rumiantes comparado con la de otros mamíferos (Larson y Hegarty, 1979). En leches fermentadas la concentración de este ácido depende principalmente del agregado de suero (por ser un componente soluble) y de las condiciones del proceso de fermentación (Larson y Hegarty, 1979; Haggerty y col., 1984). Se conoce que es un compuesto intermedio en la síntesis de nucleótidos y puede ser utilizado como un factor de crecimiento por algunas bacterias ácido lácticas (González de Llano y col., 1996; Upreti y col., 2006). Por este motivo, algunos autores (Fernández-García y McGregor, 1994; Haggerty y col., 1984) detectaron disminuciones significativas durante el almacenamiento en yogures elaborados con diferentes cepas del cultivo starter. Sin embargo, en el presente trabajo, hemos encontrado concentraciones similares para todos los yogures durante la elaboración y almacenamiento, señalando que los cultivos utilizados no fueron capaces de catabolizar este ácido orgánico. Resultados similares fueron encontrados por La Torre y col. (2003) y Ekinci y Gurel (2008).

### **II.3 Conclusiones**

En el presente Capítulo, se analizó el efecto de diferentes variables tales como la dosis de enzima  $\beta$ -galactosidasa y el nivel de suplementación con LPD y WPC, sobre el proceso de hidrólisis de lactosa y actividad metabólica del starter en elaboraciones de yogur natural y con sacarosa a escala laboratorio de 5 L.

Los porcentajes de hidrólisis estuvieron siempre por encima de 72% y alcanzaron niveles de hasta 94%, dependiendo del nivel de enzima empleada y del tipo de producto. Los niveles de reducción conseguidos están de acuerdo con los límites establecidos por la Legislación Argentina (CAAb, 2013) para “alimentos modificados en su composición glucídica”. Las concentraciones residuales de lactosa en los yogures recién elaborados fueron bajas, oscilaron entre 0,42 y 1,61 g/100 g, correspondiendo los menores valores a los yogures deslactosados tipo bebible y los mayores para los productos tipo batido. Además, el pH, la acidez titulable y sinéresis de los yogures durante el almacenamiento a temperatura de refrigeración fueron adecuados. En general, se observó que los yogures deslactosados presentaron menores valores de postacidificación, lo cual se correlacionó con los menores niveles de ácido láctico detectados en estos yogures. Este hecho puede ser atribuido a pequeños cambios en la actividad metabólica de los microorganismos del fermento implicada en la generación de ácidos orgánicos, a causa de las modificaciones producidas en el perfil de carbohidratos de la matriz de yogur principalmente por la inclusión de la enzima exógena.

---

# CAPÍTULO III

---

Elaboración de Yogures  
Deslactosados y con Propiedades  
Funcionales Incrementadas

### III.1 Introducción

El empleo de bacterias probióticas y de sustancias prebióticas en yogures es una práctica habitual desde hace varios años. Se conoce que dichas bacterias proporcionan múltiples beneficios terapéuticos, en particular, una de las propiedades benéficas que se les atribuyen es la disminución de los síntomas que provoca la intolerancia a la lactosa. De esta manera, la incorporación de probióticos a yogures deslactosados ayudaría a incrementar las propiedades tendientes a disminuir los malestares que en algunos casos ocasiona la mala absorción de lactosa (Lourens-Hattingh y Viljoen, 2001; Hekmat y Reid, 2006; Salminen y col., 2011). Los prebióticos son carbohidratos no digeribles que en forma selectiva estimulan el crecimiento y/o la actividad de la microflora gastrointestinal benéfica, aportando beneficios y bienestar al hospedador (Saad y col., 2013). Existen gran cantidad de cepas reconocidas como probióticas pero las más utilizadas para la elaboración de leches fermentadas son *L. acidophilus*, *L. casei* y *Bifidobacterium* spp, las cuales pueden ser adicionadas junto con el starter o al finalizar el proceso de fermentación (Heller, 2001; Lourens-Hattingh y Viljoen, 2001; Tamime y Robinson, 2007; Surono y Hosono, 2011). Con respecto a los prebióticos, uno de los compuestos que ha sido ampliamente utilizado es la inulina. Este compuesto es un fructano ya que está formado por una cadena lineal de moléculas de fructosa (de 2 a 60). Está presente naturalmente en muchos vegetales, frutas y cereales, pero a nivel industrial se la extrae de la raíz de la achicoria (*Cichorium inatybus*) (Madrigal y Sangronis, 2007). Se la emplea como fibra dietaria, agente espesante o para reemplazar azúcar en combinación con edulcorantes no nutritivos y como sustituto de la grasa. De esta manera, se puede usar la inulina para desarrollar alimentos bajos en grasa, azúcar y calorías (sólo aporta 1,5 kcal/g) (Madrigal y Sangronis, 2007). Sin embargo, su incorporación en alimentos fermentados podría afectar la velocidad de fermentación y viabilidad del cultivo starter, la formación de compuestos producidos en una fermentación ácido láctica y el grado de proteólisis e impactar finalmente en las propiedades sensoriales (Güven y col., 2005; Kip y col., 2006; Routray y Mishra, 2011).

En muchos casos el uso de bacterias probióticas en yogur va acompañado del agregado de prebióticos. Algunos trabajos reportan el efecto positivo de los prebióticos sobre los probióticos en términos de crecimiento y sobrevivencia, pero en otros casos no se muestra ningún efecto notable (Mazloomi y col., 2011). La interacción entre los probióticos y prebióticos en el yogur es todavía un tema no resuelto y controversial.

Sin embargo, los conocidos beneficios de los probióticos y prebióticos en la salud humana han estado ejerciendo desde los últimos años un fuerte impacto en el mercado de las leches fermentadas y yogur, influyendo positivamente en la preferencia del consumidor (Routray y Mishra, 2011).

Por otro lado, muchos estudios han demostrado la presencia de moléculas bioactivas, es decir de compuestos químicos que ejercen actividades biológicas específicas, en la leche y los productos lácteos (Shah, 2000; Wildman, 2001; Saxelin y col., 2003; Korhonen, 2009). Dentro de la familia de los hidratos de carbono los oligosacáridos de galactosa, galacto-oligosacáridos (GOS), son un grupo importante de compuestos bioactivos. Se encuentran naturalmente en la leche humana y a nivel de trazas en la leche de rumiantes, pero también pueden generarse en los productos fermentados durante su manufactura. Asimismo, se los puede agregar a una gran variedad de alimentos, su excelente sabor los hace interesantes como edulcorantes funcionales. Tienen bajo poder calórico y son anticariogénicos ya que no pueden ser metabolizados por los microorganismos de la cavidad bucal responsables de la formación de caries dentales (*S. mutans*) (Splechtna y col., 2006). Dosis de 2 – 10 g/día de GOS han demostrado un efecto bifidogénico significativo, aunque ingestas superiores a 30 g/día producen diarreas (Playne, 2004).

La fórmula genérica de GOS se puede representar como D-[ $\beta$ -D-Galactosa]<sub>n</sub>-Glucosa, donde “n” corresponde a las unidades de galactosa (2 – 10) (Sako y col., 1999; Cardelle-Cobas y col., 2009; Gosling y col., 2009; Park y Oh, 2010). Se obtienen principalmente por vía enzimática, mediante la acción de la enzima  $\beta$ -galactosidasa utilizando la lactosa como sustrato, en una reacción de *transgalactosilación*, reacción de condensación que ocurre simultáneamente con la reacción de hidrólisis (Sako y col., 1999). El resultado es una disminución de lactosa, un incremento de monosacáridos y una mezcla compleja y heterogénea de GOS (di-, tri-, tetra-, penta-oligosacáridos, etc) (Gosling y col., 2009). Las proporciones y tipo de GOS formados dependen del origen de la enzima utilizada y de las condiciones de reacción, entre otros factores (Sako y col., 1999). La formación de GOS se ve favorecida a alta concentración de lactosa, mientras que la reacción de hidrólisis ocurre predominantemente a baja concentración (Martínez-Villaluenga y col., 2008b).

Otro tema de importancia en la actualidad es la creciente demanda de productos de valor energético o calórico reducido. En particular, los alimentos de contenido lipídico reducido son aquellos que contienen como máximo el 50% del contenido lipídico del alimento corriente correspondiente (CAAc, 2013). Como resultado a la demanda en este tipo de productos, hay también un creciente uso de aditivos edulcorantes tales como aspartamo,

acetosulfameK, sacarina, stevia, entre otros y una mayor oferta de productos reducidos en el contenido de materia grasa. El yogur no está exento a esta situación sino que responde a dicha demanda, por lo que existe en las góndolas de los supermercados una gran cantidad de variedades cuyo contenido calórico se ha reducido.

Particularmente, el edulcorante no nutritivo aspartamo, es un dipéptido que aporta 4 cal/g, pero al emplearse en concentraciones muy pequeñas en los alimentos su contribución calórica es insignificante. Para ser empleado en yogur implica tener presente ciertos aspectos como su inestabilidad al calor y a las condiciones ácidas de la matriz y por otro lado el efecto que puede ejercer en la fermentación. En efecto, el aspartamo se descompone a dicetopiperazina con la excesiva exposición al calor, pero es razonablemente estable a las temperaturas de fermentación. Sin embargo, debido a que es parcialmente metabolizado por las bacterias del cultivo starter, se lo suele adicionar al finalizar el proceso fermentativo (Chandan y O'Rell, 2006b).

En este Capítulo se describen las experiencias realizadas dirigidas a obtener yogures deslactosados con propiedades funcionales incrementadas y reducidos en valor calórico. Para ello, se elaboraron yogures enteros (con sacarosa) y parcialmente descremados (con aspartamo), y se incorporaron el cultivo probiótico *L. acidophilus* La-5 y el prebiótico inulina. Se evaluó la formación *in situ* de GOS mediante el análisis de los perfiles de carbohidratos, además se cuantificaron los ácidos orgánicos y los parámetros de calidad global de los productos obtenidos (pH, acidez titulable, sinéresis) y composición química global.

## **III.2 Materiales y métodos**

### **III.2.1 Diseño experimental**

Se realizaron elaboraciones de yogures enteros con adición de sacarosa y parcialmente descremados con adición de aspartamo. Para cada caso, se estudiaron tres factores a dos niveles: la adición de enzima  $\beta$ -galactosidasa, el agregado de polvos lácteos y la incorporación de *L. acidophilus* La-5 y de inulina, lo que generó 8 tratamientos ( $2^3 = 8$ ) tanto para los yogures enteros como para los parcialmente descremados. Las experiencias se realizaron por triplicado obteniéndose un total de 48 unidades experimentales. En la **Tabla III.1** se muestra el diseño experimental.



**Tabla III. 1:** Diseño experimental.

Factor ensayado	Niveles	
	N1	N2
<b>F1:</b> Enzima	Sin adición	Con adición
<b>F2:</b> Sólidos lácteos	Sin adición	Con adición
<b>F3:</b> Probiótico/prebiótico	Sin adición	Con adición

Los niveles de enzima fueron seleccionados teniendo en cuenta el mínimo nivel necesario para obtener productos reducidos en lactosa, de manera de evitar un incremento innecesario en el costo del producto final. Por su parte, se eligió el mayor nivel de sólidos, ya que en el Capítulo anterior se observó que este producto, en comparación con el nivel intermedio, presentaba mayor consistencia y lo diferenciaba marcadamente del tipo bebible. Además, se favorecería la formación de GOS por la mayor cantidad de lactosa en la leche base.

En la **Tabla III.2** se presenta la denominación para cada tipo de yogur.

**Tabla III. 2:** Denominación de los yogures.

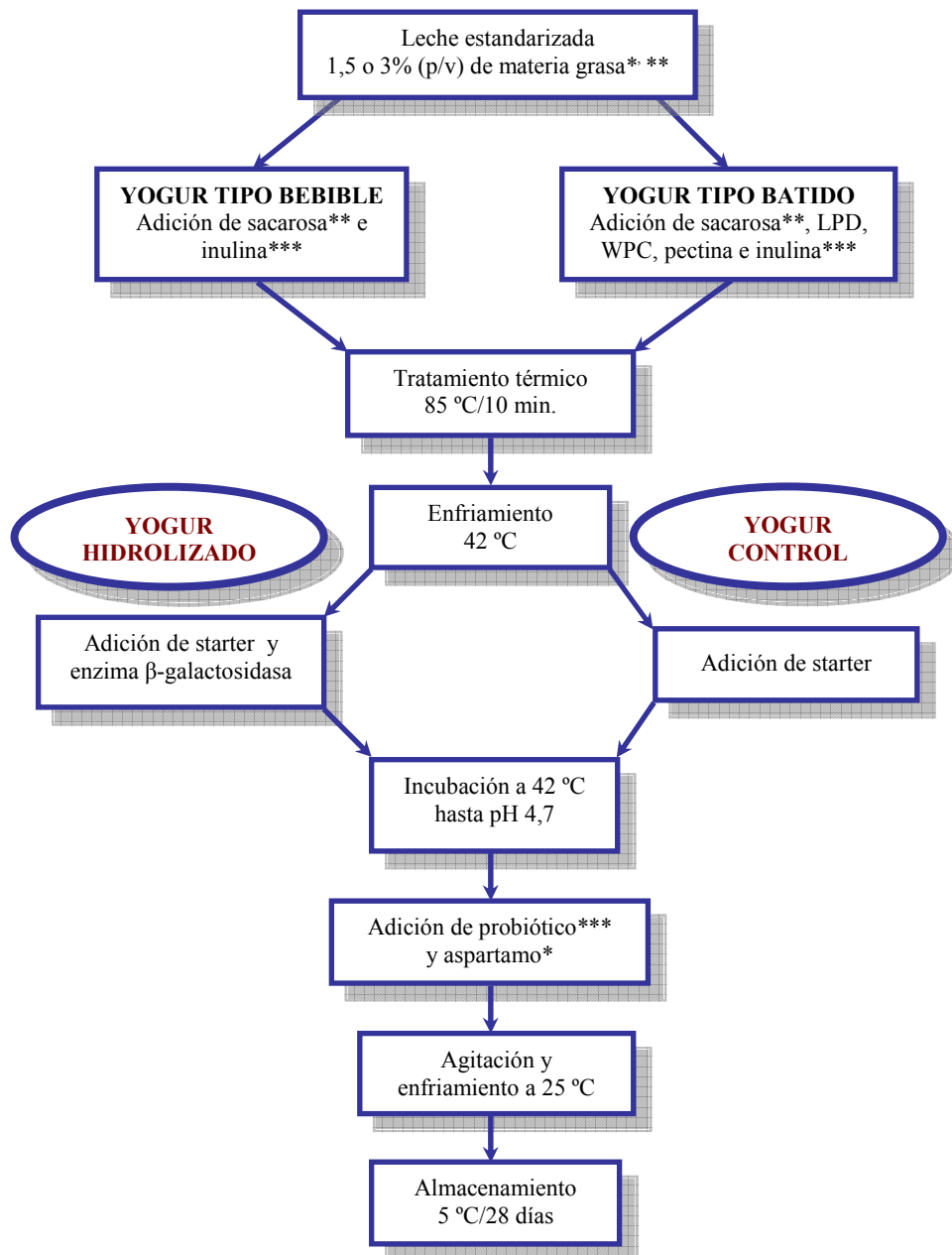
Yogur elaborado con leche parcialmente desc. y aspartamo	Yogur elaborado con leche entera y sacarosa	F1: Adición de enzima (g/L)	F2: Adición de sólidos lácteos (g/100 mL)	F3: Adición de probiótico/prebiótico	Tipo de yogur
<b>Ca</b>	<b>Cs</b>	0,00	0,0	-	Bebible
<b>Ha</b>	<b>Hs</b>	0,16	0,0	-	
<b>CPa</b>	<b>CPs</b>	0,00	0,0	✓	
<b>HPa</b>	<b>HPs</b>	0,16	0,0	✓	
<b>Cla</b>	<b>CIa</b>	0,00	4,4	-	Batido
<b>Hla</b>	<b>HIa</b>	0,25	4,4	-	
<b>CIPa</b>	<b>CIPs</b>	0,00	4,4	✓	
<b>HIPa</b>	<b>HIPs</b>	0,25	4,4	✓	

C: control. H: hidrolizado. P: probiótico/prebiótico. I: sólidos lácteos. a: aspartamo. s: sacarosa.

### III.2.2 Elaboración de yogur

Se empleó el procedimiento descrito en la sección 3.1.2 del Capítulo I con algunas modificaciones que se detallan a continuación. La leche pasteurizada y estandarizada a 1,5% p/v en el contenido de materia grasa para los productos parcialmente descremados y

3% p/v para los enteros, fue distribuida en las tinas de 5 L. Previo al tratamiento térmico, se adicionó sacarosa 8% p/v, 4,4% p/v de la mezcla LPD: WPC 35%: pectina y la inulina 1% p/v (Orafti®GR, Canadá), según corresponda y luego se siguió con el procedimiento. Cuando se alcanzó el valor de pH 4,7 se adicionó el aspartamo 0,3 g/L de leche (Ajinomoto, Japón) a los yogures parcialmente descremados y el cultivo probiótico *L. acidophilus* La-5 (Chr Hansen, Dinamarca) en los yogures que contenían inulina y se comenzó con el proceso de enfriamiento. Se tomaron muestras en diferentes momentos durante la fermentación (0, 45 y 150 min y al final de la elaboración) y durante el almacenamiento (1, 7, 14, 21 y 28 días) para analizar pH, acidez titulable, sinéresis, perfiles de carbohidratos (lactosa, glucosa, galactosa y GOS) y de ácidos orgánicos (láctico, cítrico, butírico, hipúrico y orótico). El recuento de bacterias totales y del probiótico se realizó al día siguiente de la elaboración y a los 21 días de almacenamiento refrigerado, mientras que el análisis de hongos y levaduras se llevó a cabo a los 21 días. A los 7 días se determinó la composición global (grasa, sólidos totales y proteínas totales). El esquema de elaboración se muestra en la **Figura III.1**.



\* Para los yogures con 1,5% de materia grasa se adicionó aspartamo.

\*\* Para los yogures con 3% de materia grasa se adicionó sacarosa.

\*\*\* Para los yogures funcionales se adicionó inulina y el cultivo probiótico.

**Figura III. 1:** Esquema de elaboración de los distintos yogures.

### III.2.3 Determinaciones analíticas

✓ *Sólidos totales, materia grasa, proteínas totales y sinéresis*

Los análisis se efectuaron según las técnicas descritas en la sección 2.3 del Capítulo II.

---

---

✓ ***pH y acidez titulable***

De acuerdo a lo detallado en la sección 3.1.3 del Capítulo I.

✓ ***Análisis microbiológicos***

Se pesó en condiciones de asepsia 1 g de yogur en un tubo estéril, y luego se adicionaron 9 mL de solución de agua de peptona de caseína 0,1% p/v estéril (autoclave, 121 °C/15 min) (Microquim, Argentina). La mezcla se homogeneizó durante aproximadamente 1 min en vortex y luego se realizaron diluciones decimales sucesivas en agua de peptona de caseína 0,1% p/v estéril. De acuerdo al grupo microbiano analizado se sembró en diferentes medios las diluciones apropiadas: 0,1 mL en superficie en placas conteniendo Agar leche descremada (APC-leche) para el recuento de bacterias del starter de yogur y Agar MRS (Biokar, Francia) para *L. acidophilus* y 1 mL en profundidad en placas con Agar cloranfenicol – dextrosa (glucosa) - extracto de levadura (ACGY) para hongos y levaduras (Frank y col., 1993). El recuento de las bacterias del starter se realizó luego de 48 h de incubación de las placas a 37 °C (Frank y col., 1993). Las bacterias de *L. acidophilus* La-5 se enumeraron luego de la incubación de las placas a 37 °C durante 48 h bajo condiciones de microaerofilia (Vinderola y col., 2000). El recuento de hongos y levaduras se llevó a cabo luego de 5 días de incubación de las placas a 25 °C (Frank y col., 1993).

✓ ***Perfiles de carbohidratos y de ácidos orgánicos***

La concentración de los carbohidratos y de los ácidos orgánicos se determinó según la metodología detallada en la sección 2.3 del Capítulo II. Además se analizó la concentración de galacto-oligosacáridos (GOS) en los productos enteros con sacarosa. Los GOS se identificaron como trisacáridos por comparación de los cromatogramas de los yogures con el de una preparación comercial de alta concentración de GOS, Vivinal®GOS (Friesland Campina Domo, Dinamarca) y se empleó la curva de calibrado de una solución patrón de rafinosa para su cuantificación (Ingignoli, 2013).

✓ ***Análisis Estadístico***

Para el análisis estadístico, se utilizó el software SPSS 10.0 (SPSS Inc, Chicago, USA). Se calcularon el promedio y la desviación estándar y se aplicó un ANOVA de tres vías utilizando el modelo lineal general con un 95% de confianza para detectar diferencias significativas entre los tratamientos analizados.

### III.3 Resultados

#### III.3.1 Composición global, recuentos microbiológicos y sinéresis

Los resultados de composición global de los yogures se muestran en la **Tabla III.3**.

**Tabla III. 3:** Valores de composición global de los diferentes yogures.

Adición de sólidos	Adición de pro/pre	Adición de enzima	Código del yogur	Parámetro medido (g/100 g)		
				Materia grasa	Sólidos totales	Proteínas totales
0,0	-	0,00	<b>Ca</b>	1,4 ± 0,1	10,04 ± 0,02	3,32 ± 0,02
		0,16	<b>Ha</b>	1,4 ± 0,1	9,87 ± 0,05	3,31 ± 0,04
	✓	0,00	<b>CPa</b>	1,4 ± 0,1	10,94 ± 0,08	3,31 ± 0,01
		0,16	<b>HPa</b>	1,4 ± 0,3	10,83 ± 0,12	3,33 ± 0,03
4,4	-	0,00	<b>CIa</b>	1,4 ± 0,1	13,55 ± 0,13	4,61 ± 0,05
		0,25	<b>HIa</b>	1,3 ± 0,1	13,31 ± 0,07	4,72 ± 0,13
	✓	0,00	<b>CIPa</b>	1,4 ± 0,2	14,59 ± 0,09	4,58 ± 0,07
		0,25	<b>HIPa</b>	1,6 ± 0,3	14,51 ± 0,11	4,62 ± 0,09
0,0	-	0,00	<b>Cs</b>	2,8 ± 0,2	17,88 ± 0,15	3,01 ± 0,06
		0,16	<b>Hs</b>	3,0 ± 0,1	17,88 ± 0,15	3,00 ± 0,02
	✓	0,00	<b>CPs</b>	2,5 ± 0,2	18,51 ± 0,13	3,03 ± 0,05
		0,16	<b>HPs</b>	2,6 ± 0,1	18,59 ± 0,08	3,03 ± 0,05
4,4	-	0,00	<b>CI</b> s	2,6 ± 0,2	20,42 ± 0,22	4,20 ± 0,03
		0,25	<b>HI</b> s	2,7 ± 0,2	20,57 ± 0,07	4,13 ± 0,07
	✓	0,00	<b>CIP</b> s	2,6 ± 0,1	21,38 ± 0,12	4,24 ± 0,07
		0,25	<b>HIP</b> s	2,6 ± 0,2	21,37 ± 0,04	4,22 ± 0,01

Los yogures parcialmente descremados con aspartamo presentaron porcentajes de materia grasa entre 1,3 y 1,6%; no se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los diferentes productos. Los sólidos totales estuvieron entre 9,9 y 14,6 g/100 g; como era esperable, se incrementaron significativamente ( $p < 0,05$ ) tanto con la adición de sólidos lácteos como con la incorporación de inulina. Los valores de proteínas aumentaron significativamente ( $p < 0,05$ ) desde aprox. 3,3 hasta 4,7 g/100 g para los productos sin y con adición de sólidos lácteos, respectivamente.

Por su parte los yogures elaborados con leche entera y sacarosa presentaron porcentajes de materia grasa desde 2,5 a 3,0%; no se evidenciaron diferencias significativas entre los

productos. Los sólidos totales se incrementaron notablemente debido a la adición de la sacarosa, y estuvieron en valores de 17,9 y 21,4 g/100 g, presentando incrementos significativos ( $p < 0,05$ ) tanto con la adición de sólidos lácteos como con el agregado de inulina. Los valores de proteínas también aumentaron significativamente ( $p < 0,05$ ) desde aprox. 3,0 hasta 4,2 g/100 g con la adición de sólidos lácteos.

La inclusión de la enzima no produjo modificaciones en ninguno de los parámetros mencionados.

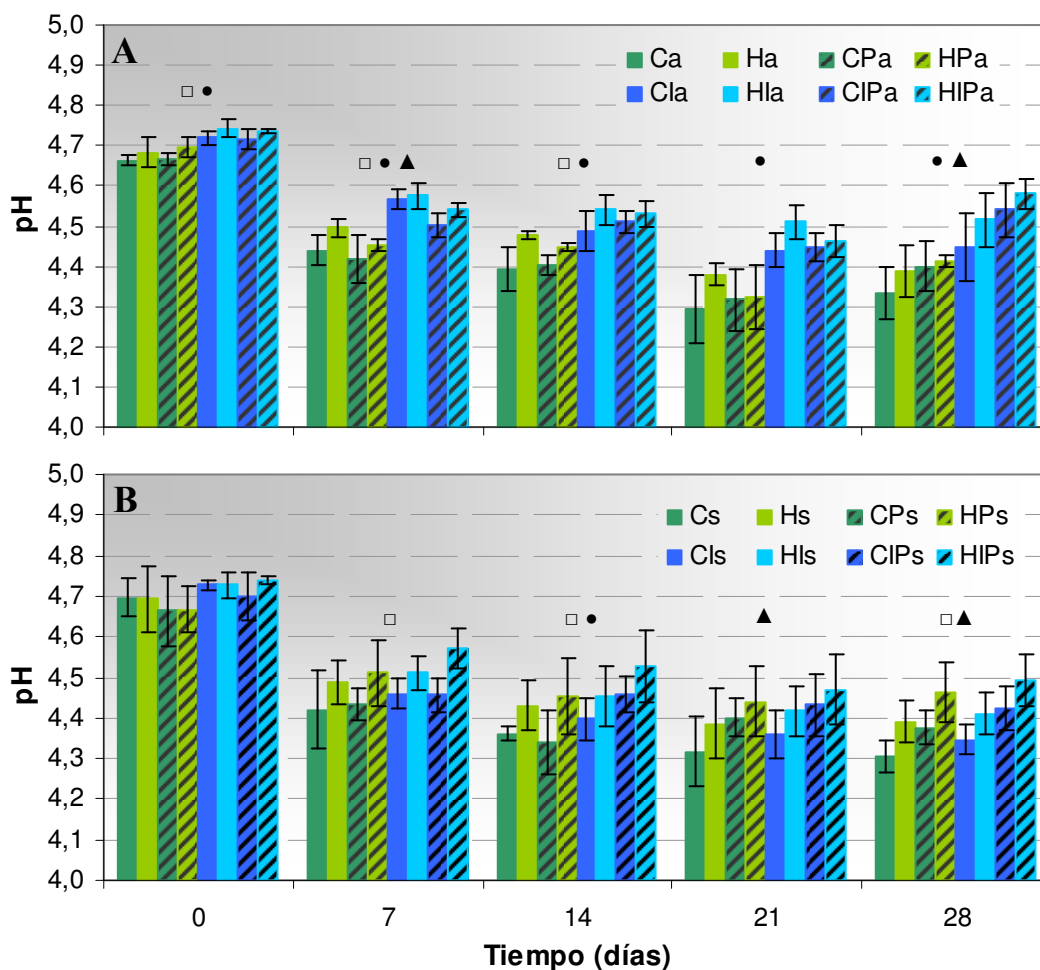
Los recuentos de bacterias del starter se encontraron en valores de  $10^8$  y  $10^9$  UFC/g para todos los productos recién elaborados, los cuales se mantuvieron en algunos casos y en otros disminuyeron un orden a los 21 días. En general se pudo apreciar que los productos hidrolizados presentaron recuentos ligeramente inferiores que los controles. En cuanto a los yogures con adición del cultivo probiótico, los recuentos estuvieron entre  $10^6$  y  $10^7$  UFC/g en el yogur fresco, y permanecieron invariables durante el período de refrigeración. Los recuentos de hongos y levaduras en todos los productos se encontraron en niveles inferiores a 50 UFC/g. No se observaron diferencias en cuanto a la adición de aspartamo y sacarosa ni con la presencia o ausencia de sólidos lácteos.

En cuanto a la sinéresis, este parámetro se incrementó progresivamente durante el período de almacenamiento refrigerado en todos los yogures tipo bebibles. A los 28 días, los yogures enteros tuvieron un porcentaje de expulsión de suero de aprox. 6 mL/100 mL, mientras que los productos parcialmente descremados presentaron valores de hasta 10 mL/100 mL. No se observaron diferencias en cuanto a la adición de enzima y probiótico/prebiótico. No se evidenció separación de suero en los productos batidos.

### **III.3.2 pH y acidez titulable**

La evolución del pH fue similar a la obtenida para los yogures estudiados en el Capítulo anterior. El principal descenso se produjo desde los 45 min hasta el final de la manufactura. Se evidenciaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en las leches y a los 45 min de elaboración entre los yogures bebibles y batidos, presentando estos últimos menores valores de pH. A los 150 min se observó que los yogures sin sacarosa y con inulina tuvieron menores valores de pH ( $p < 0,05$ ) que aquellos que no tenían este ingrediente. No se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) con la adición de enzima (datos no mostrados).

En la **Figura III.2** se presenta la evolución del pH de los yogures durante el almacenamiento.



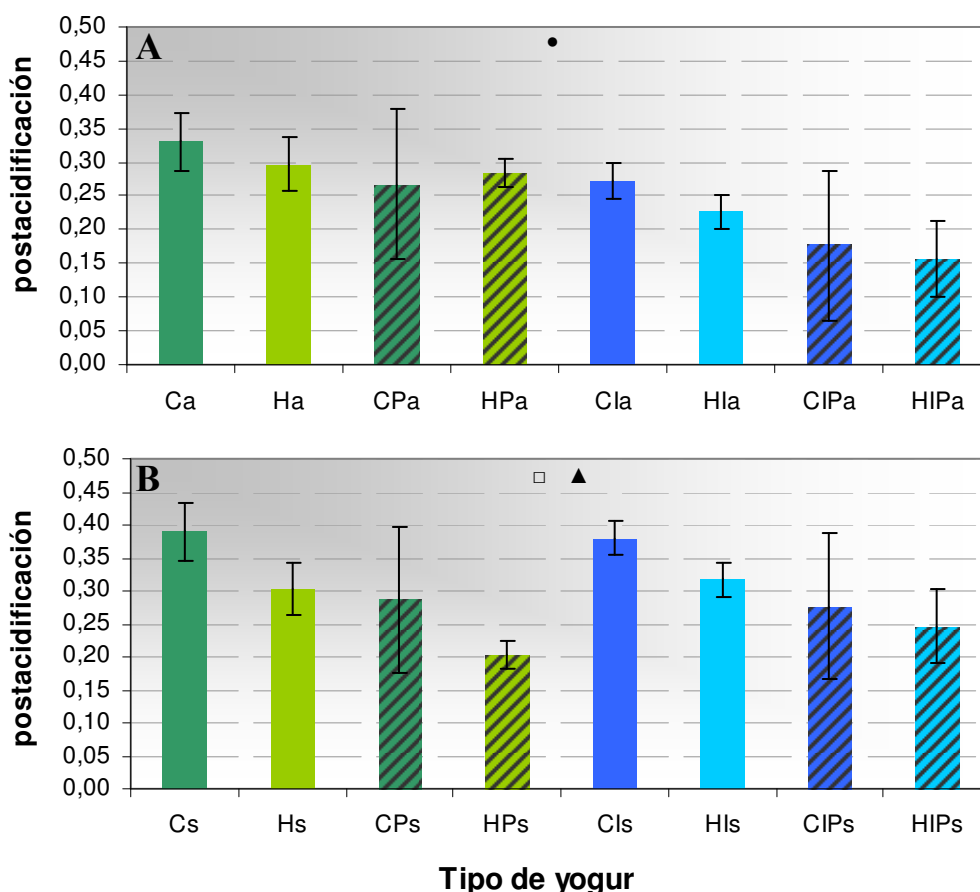
**Figura III. 2:** Evolución del pH de yogures con aspartamo (A) y con sacarosa (B) con adición de diferentes niveles de enzima, de sólidos lácteos y probiótico/prebiótico durante el almacenamiento (5 °C/28 d).

Los símbolos correspondientes a cada tiempo analizado indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) para cada uno de los factores estudiados: adición de enzima ( $\square$ ), agregado de sólidos lácteos ( $\bullet$ ) e incorporación de probiótico/prebiótico ( $\blacktriangle$ ).

En los yogures descremados con aspartamo (A), la adición de sólidos lácteos fue el factor que más influenció, durante todo el período de almacenamiento los productos tipo batido tuvieron valores significativamente mayores ( $p < 0,05$ ) comparados con los bebibles. El siguiente factor que afectó fue la enzima, a los 0, 7 y 14 días los yogures controles presentaron menores valores ( $p < 0,05$ ) que los hidrolizados. Por último, la presencia de probiótico/prebiótico fue el factor que menos modificó el valor de pH, sólo se observaron diferencias significativas a los 7 y 28 días; a los 7 días los yogures con prob/preb presentaron menores valores de pH, invirtiéndose este comportamiento a los 28 días.

Los yogures elaborados con leche entera y sacarosa (**B**), presentaron un comportamiento algo diferente. La adición de enzima fue el factor que más influyó, a los 7, 14 y 28 días valores significativamente mayores ( $p < 0,05$ ) se obtuvieron en los yogures hidrolizados comparados a los controles. La incorporación de prob/preb produjo cambios significativos a los 21 y 28 días y el efecto de la adición de sólidos sólo se evidenció a los 14 días; los mayores valores en cada caso fueron para los productos con prob/preb y batidos.

En lo que respecta a lo postacidificación (**Fig. III.3**), en los yogures con aspartamo (**A**) sólo hubo diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) con la adición de sólidos de leche, lo que produjo una disminución en la postacidificación; mientras que en los productos con sacarosa (**B**) afectaron significativamente ( $p < 0,05$ ) la adición de la enzima y de prob/preb, ambos también produjeron una disminución en la postacidificación.

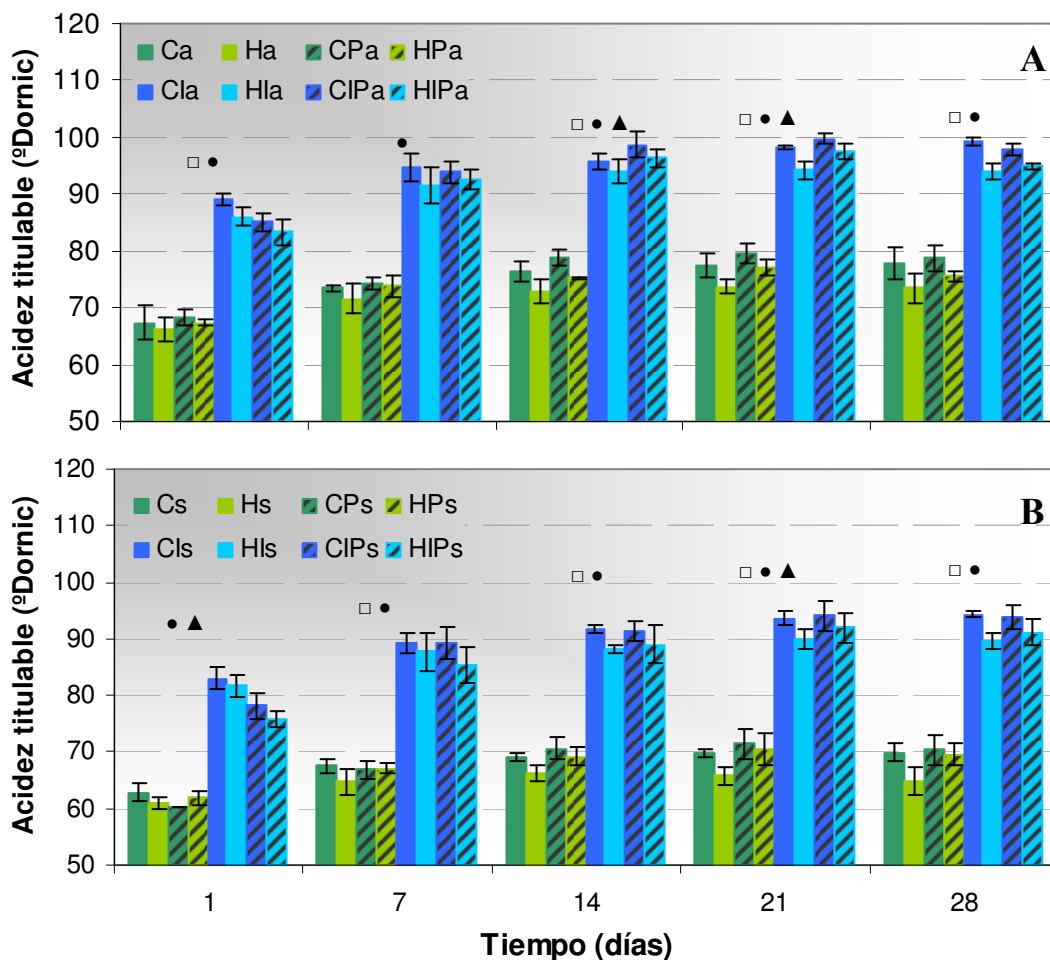


**Figura III. 3:** Postacidificación de yogures con aspartamo (A) y con sacarosa (B) con adición de diferentes niveles de enzima, de sólidos lácteos y probiótico/prebiótico.

Los símbolos indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) para cada uno de los factores estudiados: adición de enzima (□), agregado de sólidos lácteos (•) e incorporación de probiótico/prebiótico (▲).



En la **Figura III.4** se observa la evolución de la acidez titulable (AT) de los yogures durante el almacenamiento.



**Figura III. 4:** Evolución de la acidez titulable de yogures con aspartamo (A) y con sacarosa (B) con adición de diferentes niveles de enzima, de sólidos lácteos y probiótico/prebiótico durante el almacenamiento (5 °C / 28 d).

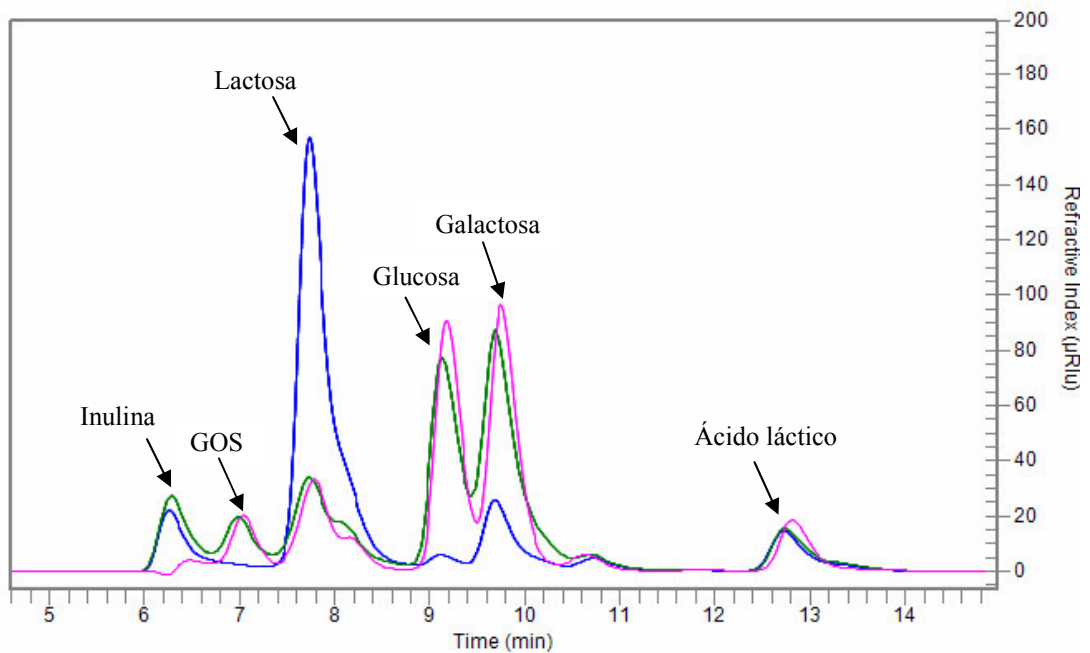
Los símbolos correspondientes a cada tiempo analizado indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) para cada uno de los factores estudiados: adición de enzima ( $\square$ ), agregado de sólidos lácteos ( $\bullet$ ) e incorporación de probiótico/prebiótico ( $\blacktriangle$ ).

El mayor incremento de este parámetro se produjo durante los primeros 7 días y luego se mantuvo relativamente constante hasta el final del almacenamiento. La incorporación de sólidos lácteos provocó un incremento significativo ( $p < 0,05$ ) de aprox. 20 grados Dornic. Por su parte, la adición de enzima causó una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) de acidez que se evidenció prácticamente en todos los tiempos analizados. El agregado de prob/preb sólo ocasionó aumentos significativos ( $p < 0,05$ ) a los 14 y 21 días en los yogures con

aspartamo y a los 21 días en los productos con sacarosa. En estos últimos yogures también se observó diferencia significativa al día 1 aunque en sentido contrario: los productos con prob/preb tuvieron menor acidez que aquellos sin prob/preb.

### III.3.3 Perfil de carbohidratos

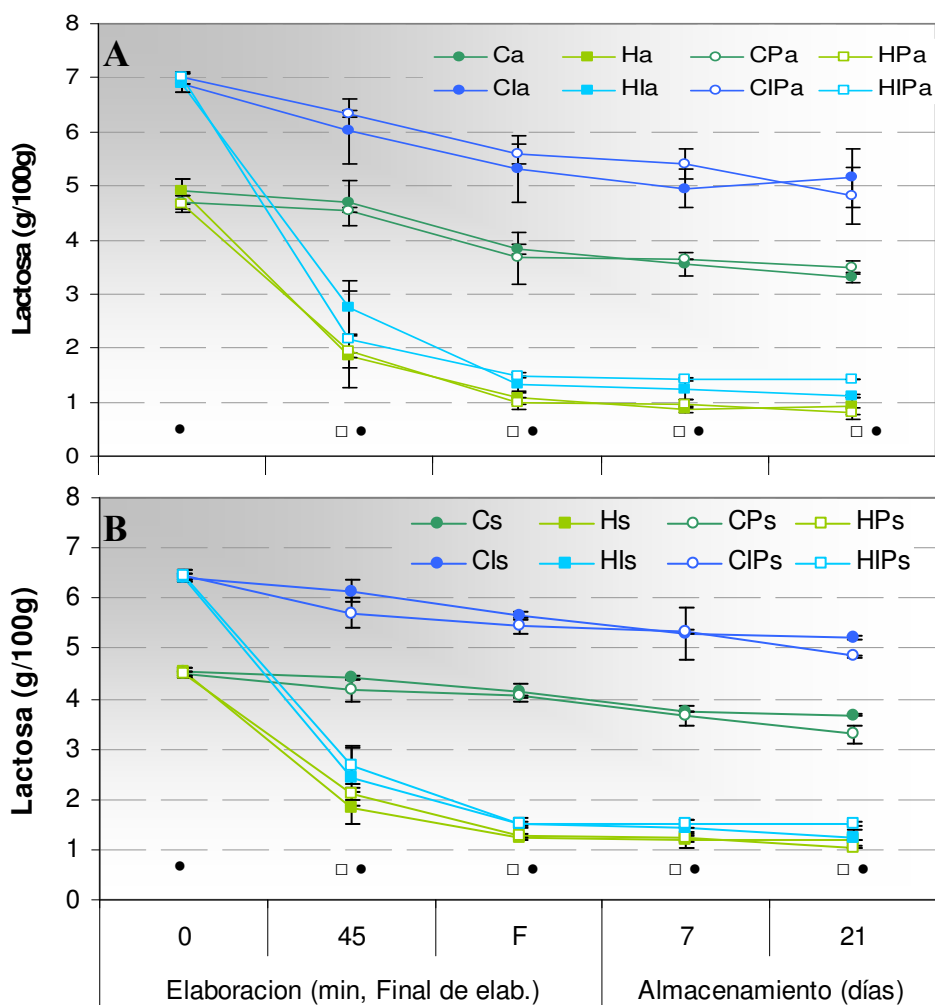
En la **Figura III.5** se observa, a modo de ejemplo, los perfiles cromatográficos de carbohidratos para varias muestras de yogur.



(—): yogur control con prob/preb; (—): yogur hidrolizado con prob/preb; (—): yogur hidrolizado sin prob/preb.

**Figura III. 5:** Perfiles de carbohidratos de diferentes yogures batidos con aspartamo a los 7 días de almacenamiento (5 °C).

En la **Figura III.6** se observa la evolución del contenido de lactosa en los distintos yogures durante la elaboración y almacenamiento refrigerado.



**Figura III. 6:** Concentración de lactosa de yogures con aspartamo (A) y con sacarosa (B) durante la elaboración y el almacenamiento (5 °C/21 d).

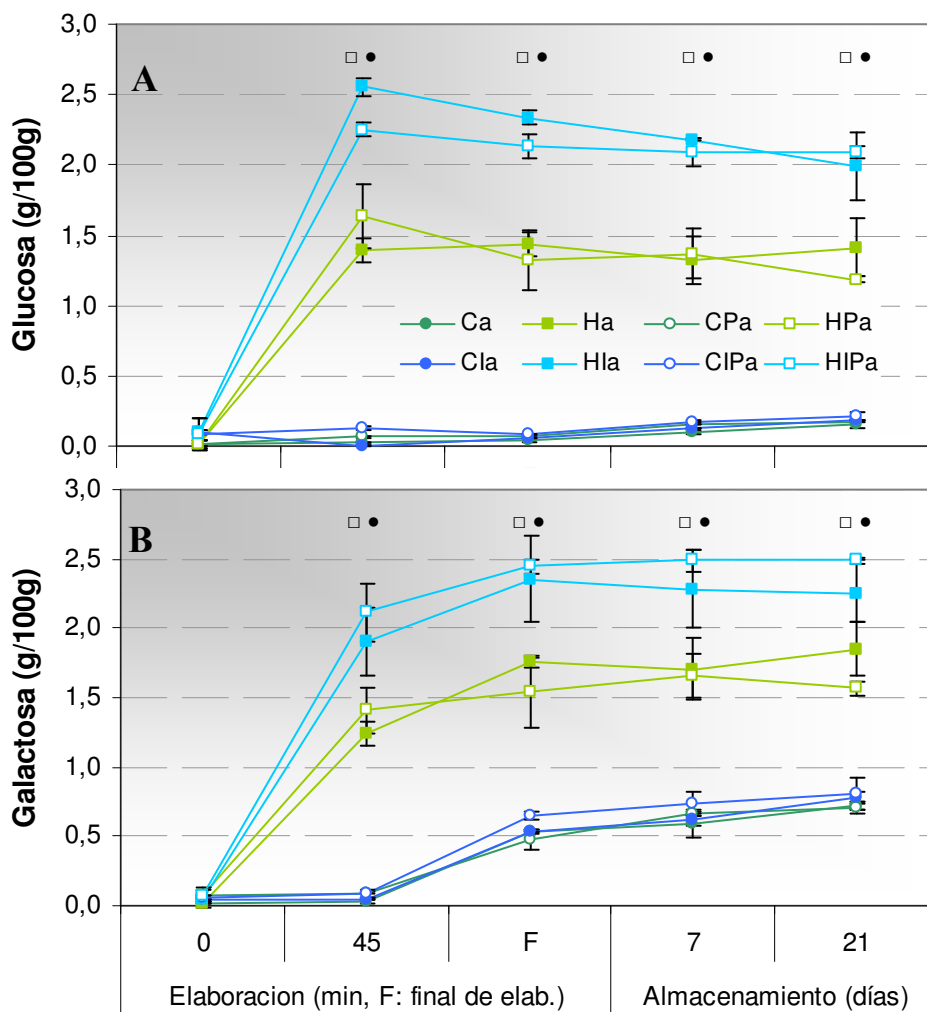
Los símbolos correspondientes a cada tiempo analizado indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) para los factores estudiados: adición de enzima ( $\square$ ) y agregado de sólidos lácteos ( $\bullet$ ).

El comportamiento que sufrió la lactosa fue análogo al discutido para los yogures estudiados en el Capítulo II. La disminución de lactosa fue similar para los yogures con aspartamo y sacarosa (A y B, respectivamente). Los yogures hidrolizados mostraron la mayor reducción de lactosa durante la elaboración y luego se mantuvieron sin cambios hasta los 21 días donde se obtuvieron valores medios de  $0,86 \pm 0,09$  y  $1,26 \pm 0,22$  g/100 g para los yogures bebibles y batidos, respectivamente. Para los controles la lactosa fue disminuyendo paulatinamente, alcanzando valores medios de  $3,40 \pm 0,14$  y  $4,98 \pm 0,23$  g/100 g a los 21 días para los yogures bebibles y batidos, respectivamente.

La adición de sólidos lácteos produjo un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) en el contenido de lactosa a todos los tiempos de muestreo. La adición de prob/preb no produjo

modificaciones significativas ( $p > 0,05$ ) durante los 21 días de almacenamiento. Se observaron interacciones entre los factores enzima-sólidos en todos los tiempos analizados, excepto para las muestras de leche y para los yogures con aspartamo a los 45 min.

En la **Figura III.7 A y B** se presentan los valores de concentración de glucosa y galactosa, respectivamente, durante la elaboración y almacenamiento de los distintos yogures elaborados con leche parcialmente descremada y adición de aspartamo.



**Figura III. 7:** Concentración de glucosa (A) y galactosa (B) de yogures con aspartamo durante la elaboración y el almacenamiento (5 °C/21 d).

Los símbolos correspondientes a cada tiempo analizado indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) para los factores estudiados: adición de enzima ( $\square$ ) y agregado de sólidos lácteos ( $\bullet$ ).

Los niveles de glucosa en los yogures hidrolizados se incrementaron bruscamente a los 45 min de elaboración hasta promedios de  $1,52 \pm 0,17$  y  $2,40 \pm 0,21$  g/100 g para los productos bebibles y batidos, respectivamente. Luego se produjo una disminución hasta los

21 días alcanzando  $1,30 \pm 0,16$  y  $2,04 \pm 0,07$  g/100 g, respectivamente. En los yogures controles, sólo se observó un ligero incremento durante el almacenamiento alcanzando valores promedios de  $0,16 \pm 0,02$  y  $0,20 \pm 0,02$  g/100 g para los productos bebibles y batidos, respectivamente. Excepto para la leche (tiempo 0), hubo diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) con la adición de enzima y sólidos lácteos en todos los tiempos analizados, teniendo mayor concentración los yogures hidrolizados batidos, concentraciones intermedias los hidrolizados bebibles y valores muy bajos los controles. La incorporación de prob/preb no produjo ninguna modificación.

La galactosa en los yogures hidrolizados experimentó un incremento importante a los 45 min y siguió aumentando levemente hacia el final de la elaboración alcanzando promedios de  $1,65 \pm 0,16$  y  $2,40 \pm 0,06$  g/100 g para los yogures bebibles y batidos, respectivamente, valores que se mantuvieron hasta los 21 días. En los yogures controles se observó un aumento progresivo desde los 45 min hasta los 21 días, alcanzando valores medios de  $0,71 \pm 0,01$  y  $0,79 \pm 0,02$  g/100 g para los productos bebibles y batidos, respectivamente. El efecto de la adición de enzima y sólidos lácteos fue el mismo que el observado para la glucosa. El agregado de prob/preb tampoco produjo modificaciones.

Para los dos monosacáridos se observaron interacciones entre los factores enzima-sólidos en todos los tiempos analizados, excepto para las muestras de leche.

En cuanto a la formación de galacto-oligosacáridos, su presencia sólo se detectó en los yogures hidrolizados, ya que en los controles estos compuestos estuvieron ausentes.

En la **Tabla III.4** se presentan las concentraciones de GOS promedio junto a su desviación estándar para los yogures hidrolizados elaborados con leche entera y sacarosa, bebibles y batidos, durante la elaboración y el almacenamiento.

**Tabla III. 4:** Concentraciones de GOS (g/100 g) en los yogures hidrolizados con sacarosa.

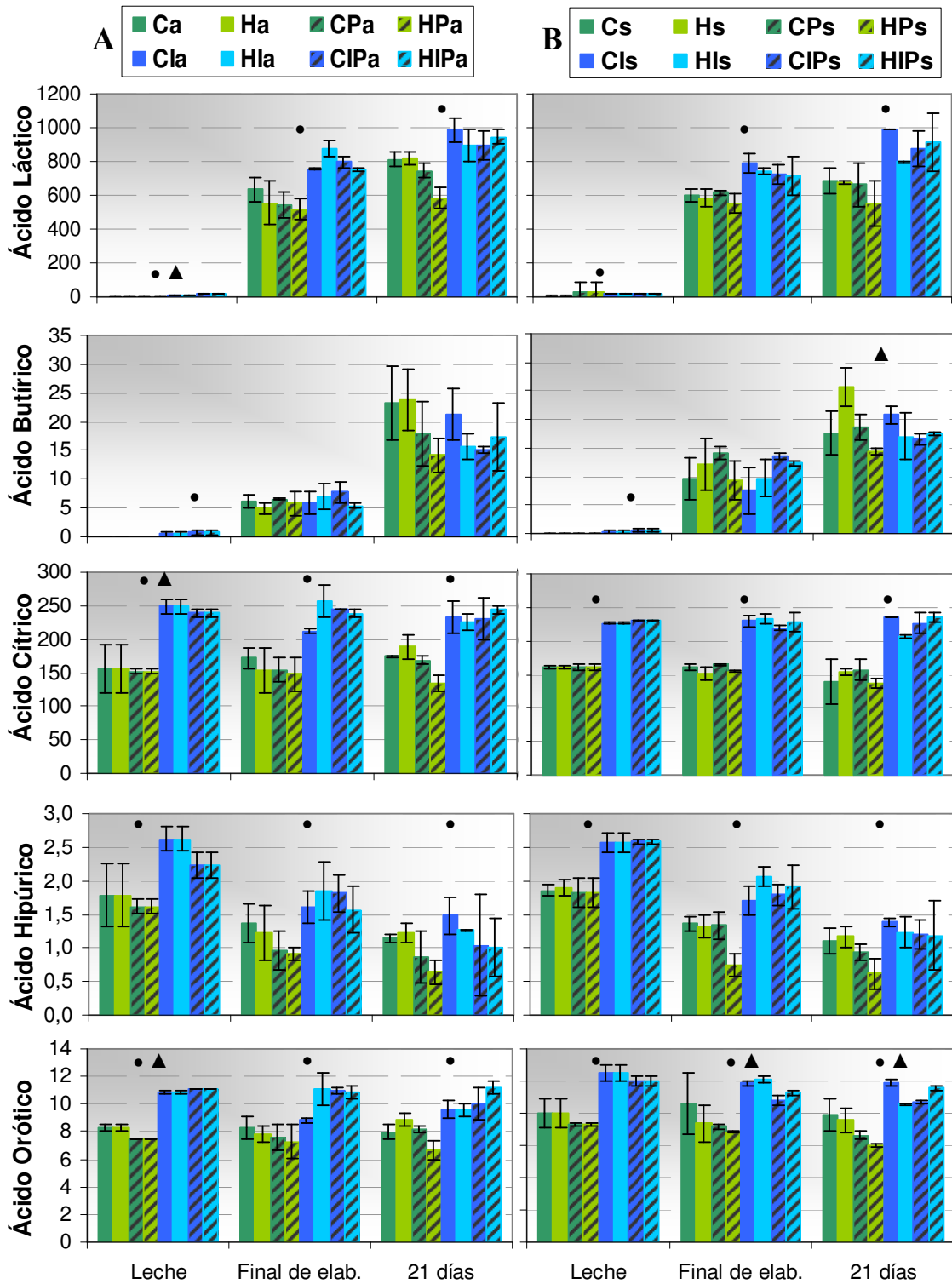
Tiempo	Yogures Bebibles		Yogures Batidos	
	Hs	HPs	HIs	HIPs
<b>0 min</b>	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>45 min</b>	$0,29 \pm 0,06$	$0,36 \pm 0,04$	$0,55 \pm 0,02$	$0,55 \pm 0,02$
<b>Final</b>	$0,33 \pm 0,02$	$0,38 \pm 0,01$	$0,61 \pm 0,02$	$0,63 \pm 0,03$
<b>7 días</b>	$0,36 \pm 0,01$	$0,39 \pm 0,03$	$0,59 \pm 0,06$	$0,66 \pm 0,02$
<b>21 días</b>	$0,33 \pm 0,01$	$0,32 \pm 0,01$	$0,52 \pm 0,03$	$0,66 \pm 0,03$

Los GOS se evidenciaron a los 45 min de fermentación, incrementándose su concentración levemente hacia el final de elaboración. Los yogures batidos tuvieron un contenido de GOS significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) en comparación a los productos tipo bebible. La incorporación de *L. acidophilus* La-5 no produjo cambios importantes en la producción de estos compuestos, excepto para los yogures batidos de 21 días que presentaron significativamente ( $p < 0,05$ ) mayor nivel.

Durante los 21 días de almacenamiento no se observaron importantes cambios en los niveles de GOS, aunque en la mayoría de los casos se registró una ligera disminución entre los 7 y 21 días.

#### **III.3.4 Perfil de ácidos orgánicos**

En la **Figura III.8** se muestra la concentración de los ácidos analizados: láctico, butírico, cítrico, hipúrico y orótico, en la leche/mezcla de partida y en los yogures al final de la elaboración y a los 21 días.



**Figura III. 8:** Concentración de ácidos orgánicos en mg/100 g en la leche/mezcla de partida, al final de la elaboración y a los 21 días de almacenamiento de yogures con aspartamo (A, lado izquierdo) y con sacarosa (B, lado derecho).

Los símbolos correspondientes a cada tiempo analizado indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) para los factores estudiados: adición de sólidos lácteos (●) y agregado de probiótico/prebiótico (▲).

Como se puede observar, la evolución y la concentración de los diferentes ácidos resultaron similares a los reportados en el Capítulo anterior. La incorporación de la enzima no causó modificaciones significativas ( $p > 0,05$ ) en ningún caso, aunque se observó una tendencia de menor producción de ácido láctico en los yogures hidrolizados. La suplementación con sólidos ocasionó un aumento relevante ( $p < 0,05$ ) en la mayoría de los ácidos. La adición de prob/preb produjo cambios significativos ( $p < 0,05$ ) sólo en algunos ácidos para algunos tiempos de muestreo. En particular, en los yogures elaborados con leche parcialmente descremada y con adición de inulina se apreció un aumento en la concentración de ácido láctico y una disminución en los ácidos cítrico y orótico al inicio del proceso. En los yogures con sacarosa la adición de prob/preb produjo disminuciones en el ácido butírico a los 21 días y en el ácido orótico al final de elaboración y a los 21 días.

#### III.4 Discusión

En el presente Capítulo se estudió la influencia del agregado de la enzima, sólidos lácteos y *L. acidophilus* La-5 e inulina en elaboraciones de yogur endulzado con sacarosa y con aspartamo. Los productos obtenidos tendrían reforzadas sus propiedades funcionales por el agregado de inulina, del cultivo probiótico y por la formación *in situ* de compuestos bioactivos con características prebióticas reconocidas, particularmente de polímeros de galactosa (GOS). Asimismo, se valoró el efecto de estos factores en una matriz de yogur con contenido reducido en materia grasa. El control del proceso fermentativo se realizó por mediciones de pH y por la cuantificación del consumo/formación de carbohidratos y de ácidos orgánicos. Durante la conservación se efectuaron análisis de composición química global y recuentos microbiológicos, y se realizó un seguimiento de pH, acidez titulable y perfiles de carbohidratos y de ácidos orgánicos.

Los resultados de los recuentos microbiológicos estuvieron de acuerdo a lo señalado por el Código Alimentario Argentino (CAAa, 2010; CAAd, 2013) para yogur, el cual establece que los recuentos de bacterias lácticas totales deben ser como mínimo de  $10^7$  UFC/g, el del cultivo probiótico mayor a  $10^6$  UFC/g y el de hongos y levaduras no debe superar las 50 UFC/g. El número de bacterias probióticas requeridos para producir un efecto benéfico no está bien establecido. Algunos autores sugieren que para obtener un efecto terapéutico, el mínimo número de microorganismos probióticos debe ser de  $10^6$  UFC/g. Sin embargo, estos valores son muy variables de especie a especie, e incluso entre cepas de una misma especie. Otros autores establecen como satisfactorios niveles mayores de  $10^6$  y  $10^7$  UFC/g (Lourens-Hattingh y Viljoen, 2001).



La evolución del pH durante la fermentación fue adecuada, similar a la discutida en el Capítulo II. En particular, se observó una disminución de pH a los 150 min de fermentación en los yogures con inulina y sin sacarosa. Similar comportamiento fue encontrado por Mazloomi y col. (2011), quienes reportaron menores valores de pH (mayores valores de acidez titulable) a las 3 h de incubación de yogures bajos en grasa a medida que se incrementaba el nivel de inulina; con 2% de inulina el pH fue de 5,13 (AT = 41 °D) y con 1% de inulina y sin la adición de este componente fue de 5,56 y 5,58, respectivamente (AT de 37 y 34 °D, respectivamente).

Durante el almacenamiento la evolución de acidez en los yogures con aspartamo y con sacarosa se encontró dentro de valores normales. En general, el agregado de LPD y WPC produjo un aumento en la acidez de los yogures (batidos) en comparación a los productos sin adición (bebibles). La inclusión de la enzima ocasionó, en general, una disminución de pH menos acentuada y por lo tanto un aumento menos pronunciado de acidez titulable, lo que se tradujo en menores valores de postacidificación. El agregado de prob/preb sólo afectó en algunos tiempos de muestreo, en general, se observó un mayor valor de pH y acidez. A los 28 días se obtuvieron valores de pH desde 4,26 a 4,61 y de acidez titulable desde 64,8 a 99,2 °D dependiendo del producto. El valor promedio de postacidificación más elevado fue de 0,36 unidades para el yogur control tipo bebible sin adición de prob/preb, y el menor de 0,20 unidades para el hidrolizado tipo batido con adición de prob/preb.

Similar observación a la obtenida en este trabajo fue realizada por Kailasapathy (2006), quien obtuvo para yogur elaborado con leche entera (18% de sólidos totales) y con *L. acidophilus* y *B. lactis* una postacidificación inferior en comparación al control, 0,27 versus 0,52, respectivamente, a los 28 días. Oliveira y col. (2009) no observaron cambios en la postacidificación de leches fermentadas con *S. thermophilus* y *L. acidophilus* adicionadas individualmente de distintas sustancias prebióticas (maltodextrina, oligofructosa y povidextrosa); en todos los casos los valores se mantuvieron en aprox. 0,18 unidades (al día 1). Otros autores han reportado valores de postacidificación más elevados. Cruz y col. (2012b) y Cruz y col. (2013) elaboraron yogures con leche entera y con adición de *B. longum* y de *L. acidophilus* y obtuvieron valores de 0,48 y 0,65 unidades, respectivamente, a los 30 días. Por su parte, Mazloomi y col. (2011) no han detectado diferencias importantes en la acidez titulable durante 14 días de almacenamiento de yogures bajos en grasa con *L. acidophilus* y fortificados con inulina (1 y 2%) comparados con sus controles. Resulta adecuado aclarar que en los trabajos en los que se incorporaron

cultivos probióticos, los mismos se agregaron junto con el starter al inicio del proceso de fermentación. Guven y col. (2005) informaron que la adición de diferentes niveles de inulina (1, 2 y 3%) en la producción de yogur batido bajo en grasa, no influyó en el desarrollo de acidez durante el almacenamiento por 15 días. Los autores concluyeron que la inulina no afectó negativamente la actividad del starter.

Con respecto a los valores de lactosa, su evolución en los yogures tipo bebible y batido, hidrolizados y controles, fue similar a la descrita en el Capítulo anterior. No se han detectado diferencias debido a modificaciones en el contenido de materia grasa de la materia prima ni a la presencia de *L. acidophilus* La-5. Con respecto al primer aspecto, Horner y col. (2011) no encontraron ningún efecto del contenido de materia grasa de la leche sobre la hidrólisis de lactosa al evaluar cinco preparaciones comerciales de enzimas (entre ellas la empleada en este trabajo de tesis: GODO-YNL2) en diferentes materias primas: leche cruda entera con 3,5% de materia grasa; leche pasteurizada entera con 3,25% de materia grasa y leche descremada con un contenido de grasa inferior a 0,5%. En relación al segundo aspecto, nuestras observaciones no se diferenciaron de las obtenidas por Cruz y col. (2012a) quienes no detectaron cambios en la concentración de lactosa del yogur, que fue de 2,9 g/100g, por inclusión de *B. longum*. Oliveira y col. (2009) elaboraron yogures y leches fermentadas descremadas con *S. thermophilus* y con diferentes bacterias probióticas agregadas individualmente (*L. acidophilus*, *L. rhamnosus* y *B. lactis*), a partir de LPD reconstituida hasta 13% de ST y con agregado de diferentes prebióticos en forma individual (maltodextrina, oligofructosa y polidextrosa) (4% p/p, de cada uno). No observaron diferencias importantes en las concentraciones de lactosa al día siguiente de ser elaborados, los valores oscilaron entre 3,7 y 4,2 g/100 g, sólo en algún caso, la incorporación de prebiótico se vio reflejado en ligeros cambios en el valor de lactosa. En particular, la presencia de *L. acidophilus* y maltodextrina no produjo modificaciones, sin embargo con oligofructosa y polidextrosa se observó un mayor contenido de lactosa residual. Por otro lado, Ibarra y col. (2012) incubaron una mezcla de leche entera con LPD (3,5%) y sacarosa (10%) durante 2,3 h con la enzima Maxilact LX5000, luego adicionaron *L. rhamnosus* y el fermento clásico de yogur y continuaron con la elaboración. Consiguieron obtener en el yogur recién elaborado un contenido en lactosa de aprox. 1 g/100 g, el que continuó disminuyendo ligeramente durante hasta aprox 0,75 g/100 g a los 30 días.

Los niveles de glucosa y galactosa en los yogures con aspartamo fueron también comparables a los mencionados en el Capítulo anterior para los productos naturales. Los cambios causados por la inclusión del probiótico/prebiótico fueron despreciables.

Las concentraciones de los ácidos orgánicos se mantuvieron en los rangos mencionados en el Capítulo II. En general, la incorporación del probiótico y de la inulina no influyó de manera importante. Resultados variables son reportados en cuanto a la influencia que tienen las bacterias probióticas sobre la producción de ácidos orgánicos. Adhikari y col. (2002) detectaron menor formación de propiónico y butírico en yogures con dos cepas de *B. longum*, respecto del control, mientras que en los ácidos acético, láctico, cítrico, úrico y pirúvico no han encontrado diferencias importantes. Asimismo, La Torre y col. (2003) evidenciaron algunas modificaciones en los contenidos de ácidos orótico, cítrico, pirúvico, láctico, úrico/fórmico, acético y hipúrico en yogures adicionados con diferentes combinaciones de *L. acidophilus*, *B. bifidum*, *B. lactis*, *B. longum* y *B. infantis*. Por su parte, Oliveira y col. (2009) observaron que la concentración de láctico en leches fermentadas conteniendo *S. thermophilus* y *L. acidophilus* fue menor (920 mg/100 g) que aquellas con *S. thermophilus* y *L. rhamnosus*, *S. thermophilus* y *L. bulgaricus*, y *S. thermophilus* y *B. lactis* (970 – 990 mg/100 g); sin embargo, cuando se incorporaron distintos prebióticos el ácido láctico aumentaba en la leche fermentada con *S. thermophilus* y *L. acidophilus* (980 – 1000 mg/100 g) y disminuía en los demás casos (910 – 960 mg/100 g). Contrariamente, Cruz y col. (2012a) no encontraron diferencias en las concentraciones de acético y láctico en yogures elaborados con y sin *B. longum*. Las variaciones encontradas en los trabajos reportados dejan en evidencia que el efecto de cooperación o antagonismo, es decir la interacción que se produce entre las cepas del starter y de cultivos probióticos durante el proceso de fermentación y almacenamiento del yogur, depende en particular de cada cepa y mezclas de cepas, así como también del nivel de inoculación, proceso de elaboración, ingredientes empleados tales como prebióticos, entre otros factores (Lourens-Hattingh y Viljoen, 2001).

Se detectó la formación de galacto-oligosacáridos (GOS) durante el proceso de elaboración en los yogures deslactosados. De esta manera se puso en evidencia la habilidad transgalactosidasa de la enzima  $\beta$ -galactosidasa empleada en este trabajo para generar estos compuestos con actividad biológica reconocida. Los yogures batidos presentaron mayor contenido de GOS en comparación a los productos tipo bebible, lo cual se atribuye a la mayor disponibilidad de lactosa en la matriz láctea que favoreció la producción de estos compuestos. Este hecho fue comprobado previamente en experiencias con solución patrón

de lactosa llevadas a cabo en nuestro instituto (Ingignoli, 2013), similar efecto fue reportado en varias publicaciones (Chockchaisawasdee y col., 2005; Martínez-Villaluenga y col., 2008a; Vera y col., 2012). La incorporación de *L. acidophilus* La-5 no produjo cambios sustanciales en la producción de GOS. Si bien la población se mantuvo en niveles elevados ( $10^6 - 10^7$  UFC/g) durante el almacenamiento de los yogures, la actividad metabólica de estos microorganismos, en particular la actividad  $\beta$ -galactosidasa intracelular, podría estar muy limitada debido a su incorporación al final de la fermentación. En relación a la estabilidad de los GOS durante la conservación de yogur, algunos autores han reportado una disminución en la concentración atribuida a procesos hidrolíticos o consumo por parte de la microbiota (Mozaffar y col., 1985), mientras que otros no encontraron modificaciones (Lamoureaux y col., 2002 y Martínez-Villaluenga y col., 2008b). En este trabajo los niveles alcanzados al final de las 4 horas de fermentación se mantuvieron sin cambios hasta la mitad del período de almacenamiento, aunque para algunos casos se registró una muy ligera disminución hacia los 21 días.

La ausencia de GOS en los yogures controles revela que las  $\beta$ -galactosidasas intracelulares de las bacterias del fermento YF-L811 no poseerían actividad transgalactosidasa en las condiciones ensayadas. Estos resultados difieren de los reportados por algunos investigadores quienes le atribuyeron la presencia de GOS en leches fermentadas a la actividad metabólica de los fermentos empleados. Toba y col. (1982, 1983) reportaron concentraciones de GOS de 0,1% (o incluso menores), mientras que Martínez-Villaluenga y col. (2008b) informaron valores de 0,20 – 0,25% para yogures tradicionales. Estos autores también observaron un incremento en la concentración por la inclusión de bacterias probióticas de los géneros lactobacilos y bifidobacterias, teniéndose valores desde 0,30 – 0,44 hasta 0,36 – 0,58 mg/100 g, respectivamente. De igual manera, Lamoureaux y col. (2002) reportaron contenidos de GOS desde 0,45 hasta 0,90% en yogures en los que se usaron cinco cepas diferentes de bifidobacterias en forma individual, en contraste con yogures control que tuvieron valores aprox. de 0,25%.

### III.5 Conclusiones

Las modificaciones de la matriz láctea estudiadas en esta oportunidad tales como la reducción del contenido de materia grasa de la materia prima y la incorporación de inulina y aspartamo, junto al agregado de un cultivo probiótico, con el propósito de tener yogures con otras características a parte de la modificación en el contenido de lactosa, no afectaron de una manera significativa la acción enzimática hidrolítica de la enzima exógena

empleada ni el desenvolvimiento normal del proceso fermentativo. Asimismo, las variantes estudiadas no impidieron la evolución habitual de los yogures durante su etapa de almacenamiento. En todos los casos la reducción del contenido de lactosa se ubicó por encima del 70%, que correspondió a contenidos de lactosa residual que oscilaron entre 0,9 y 1,6 g/100 g para los yogures tipo bebible y batido, respectivamente. Los niveles de bacterias probióticas se ubicaron dentro de los normales establecidos.

Se comprobó además la formación de oligosacáridos de galactosa o galacto-oligosacáridos (GOS), compuestos con características prebióticas reconocidas, durante la elaboración del yogur por la acción secundaria transgalactosidasa que demostró poseer la enzima  $\beta$ -galactosidasa empleada. Las concentraciones de GOS se mantuvieron en niveles elevados durante la vida útil de los productos. La presencia de estos compuestos reforzaría aún más las propiedades funcionales de los productos obtenidos.

---

# CAPÍTULO IV

---

Validación a Escala Piloto e  
Industrial

#### **IV.1 Introducción**

Las principales características de calidad de un yogur se obtienen llevando a cabo un minucioso control del proceso de elaboración. Los microorganismos del fermento, son los principales agentes responsables de la presencia de componentes aromáticos y sápidos en el yogur y de las modificaciones en la textura. Los mismos metabolizan los distintos constituyentes de la leche, principalmente la lactosa, generando un amplio número de compuestos (Imhof y col., 1995; Beshkova y col., 1998; Cheng, 2010). Luego del proceso de elaboración, continúa el almacenamiento que insume alrededor de un mes y que también, aunque en menor medida debido a la baja temperatura, se producen cambios por la microbiota presente.

El yogur exhibe un flavor delicado y de baja intensidad, a los compuestos volátiles aportados por la leche se le suman aquellos volátiles y no volátiles que se forman en gran medida durante la etapa de fermentación (Law, 1981; Ott y col., 1997; Ott y col., 1999). Se ha sugerido que la formación de aroma ocurre dentro de las primeras 24 horas de inoculación de la leche con el starter. Cambios cuantitativos en el contenido de compuestos de aroma durante el período de almacenamiento se consideran de menor significancia (Imhof y col., 1994; Ott y col., 1997). El flavor del yogur, al igual que muchas de sus propiedades físicoquímicas y reológicas, es afectado por innumerables factores, la composición química de la leche de partida, tipo y cantidad de ingredientes utilizados, actividad y cepas de los cultivos starters empleados, período de incubación, condiciones de procesamiento (tratamiento térmico, homogeneización, temperatura y tiempo de incubación) y condiciones de almacenamiento (temperatura y tiempo) (Kaminarides y col., 2007; Cheng, 2010; Güler y Park, 2011).

Más de 90 compuestos diferentes de flavor han sido identificados en yogur (Cheng, 2010). Los mismos pueden ser agrupados en diferentes categorías: ácidos no volátiles (láctico, pirúvico, etc.), ácidos volátiles (fórmico, acético, propiónico, etc.), compuestos carbonílicos (acetaldehído, acetona, butanona, acetoína, diacetilo, etc.), y un grupo de sustancias heterogéneas formadas durante la degradación térmica de las proteínas, grasa y lactosa, debido al tratamiento térmico previo al proceso de fermentación (Zourari y col., 1992; Güler y col., 2009). Si bien un gran número de compuestos volátiles han sido identificados, sólo unos pocos tienen una incidencia decisiva desde el punto de vista sensorial (Beshkova y col., 1998). La aplicación de diferentes metodologías instrumentales y sensoriales han permitido identificar los principales compuestos con alto impacto en el flavor deseable del yogur: acetaldehído, acetona, 2-butanona, 2,3-butanodiona (diacetilo),

3-hidroxi 2-butanona (acetoína), 2,3-pentanodiona, 1-octen 3-ona, 1-nonen 3-ona, benzaldehído, metional, sulfuro de dimetilo y etanol (Imhof y col., 1995; Ott y col., 1997; Schlichtherle-Cerny y Oberholzer, 2007; Cheng, 2010). Otros compuestos activos de olor incluyen benzotiazol, 3-metil butanal y ácido acético (Friedrich y Acree, 1998). Se piensa que un delicado balance de estos compuestos determina la aceptabilidad de los yogures (Alonso y Fraga, 2001; Güler y col., 2009).

El grupo de los compuestos carbonílicos tiene una decisiva influencia en el aroma global de yogur, alcanzando relativamente altas concentraciones (Kaminarides y col., 2007). Entre ellos, los compuestos más importantes son el acetaldehído, diacetilo, acetona, butanona, acetoina y 2-3 pentanodiona (Imhof y col., 1995; Alonso y Fraga, 2001). Los compuestos del grupo de los ácidos hacen la principal contribución al sabor. Además del ácido láctico, un importante número de ácidos grasos volátiles son producidos durante la fermentación, por procesos tanto lipolíticos (C4 – C10) como a través del metabolismo de la lactosa y el lactato (Cheng, 2010). El ácido acético es encontrado relativamente en altas concentraciones en los yogures, siendo un importante compuesto de flavor producido por la actividad de las bacterias lácticas del starter, las cuales lo sintetizan a partir del metabolismo de la lactosa y del ácido cítrico o del catabolismo de los aminoácidos (Kaminarides y col., 2007).

La obtención de yogures reducidos en lactosa y mejorados en sus propiedades nutricionales y funcionales representa un gran desafío tecnológico. De hecho, las modificaciones introducidas en el proceso de elaboración pueden conducir a un detrimento o favorecer las características reológicas y sensoriales. Dentro de las propiedades sensoriales de los yogures, el flavor es considerado uno de los principales atributos (Cheng, 2010). El contenido reducido de lactosa en los yogures deslactosados puede afectar el flavor, debido a que, como ya se indicó, la lactosa es el principal sustrato utilizado por el starter. Respecto a este tema no se encuentra información disponible en la literatura, ni tampoco del efecto del agregado de otros ingredientes/aditivos (sacarosa, edulcorantes, probióticos, prebióticos, etc.) en los perfiles de compuestos volátiles de los yogures.

De acuerdo a los resultados presentados en los Capítulos anteriores, se ha observado que durante la elaboración de los yogures hidrolizados y controles diferentes proporciones de lactosa, glucosa y galactosa están presentes en la matriz. Estos azúcares difieren en su poder edulcorante de 0,4; 0,6 y 0,7 para la lactosa, glucosa y galactosa, respectivamente, comparados con la sacarosa a la cual se le otorga un valor de 1 (Tamime y Robinson,



2007). Por este motivo, los productos hidrolizados tuvieron mayor dulzor que los controles.

Los experimentos de elaboración de yogur en planta piloto e industriales son necesarios para validar los resultados obtenidos en yogures preparados en condiciones de laboratorio, sobre todo si se aspira a demostrar a quienes toman decisiones en el sector productivo, que los cambios propuestos son robustos y tienen algún impacto en la matriz alimentaria real. Para ello, se requieren este tipo de pruebas y, además, ensayos sensoriales.

El objetivo de este Capítulo fue validar a escala piloto (30 L y 100 L) e industrial (4000 L) las estrategias estudiadas anteriormente en las elaboraciones de yogur a escala laboratorio y realizar análisis sensoriales de los productos obtenidos para evaluar el impacto que genera entre los consumidores. Para ello, en las elaboraciones a escala piloto de 30 L se prepararon dos variedades de yogur hidrolizado tipo batido endulzados con sacarosa: con y sin probiótico y prebiótico, y se elaboró un yogur testigo (sin enzima y sin probiótico y prebiótico). Se evaluó el perfil de compuestos de aroma y de ácidos orgánicos, la concentración de lactosa y GOS y se analizaron algunos parámetros fisicoquímicos (pH, acidez titulable, sinéresis y composición global). Asimismo, se realizaron análisis sensoriales descriptivo y de preferencia. A escala de 100 L se elaboraron yogures hidrolizados tipo bebible a los cuales se les adicionaron saborizante y colorante y se empleó una cantidad de sacarosa inferior a la utilizada en la industria, estos productos se destinaron al análisis de preferencia. Finalmente para la validación a escala industrial se elaboró un yogur hidrolizado tipo bebible con sacarosa, saborizante y colorante que se comparó con un yogur en línea.

## **IV.2 Elaboración de yogur a escala piloto**

### **IV.2.1 Materiales y métodos**

#### **IV.2.1.1 Diseño experimental**

Se elaboraron yogures tipo batido endulzados con sacarosa a escala piloto de 30 L con la tecnología intervenida en vistas de obtener dos tipos de yogures hidrolizados que se compararon con el yogur control aplicando la tecnología tradicional. Los yogures hidrolizados se prepararon adicionando la enzima simultáneamente con el starter, y a uno de ellos se le incorporó el probiótico (*L. acidophilus*, La-5) y el prebiótico (inulina). El yogur control fue elaborado sin la incorporación de la enzima y del probiótico/prebiótico. El diseño experimental se muestra en la **Tabla IV.1**.

**Tabla IV. 1:** Diseño experimental.

Denominación del yogur	Enzima (g/L)	Probiótico/Prebiótico
C	0,00	-
H	0,25	-
HP	0,25	✓

C: control. H: hidrolizado. P: probiótico/prebiótico.

Además, se realizaron dos elaboraciones de yogur bebible con un volumen de leche de 100 L sabor vainilla y frutilla con 0,25 g/L de enzima, con el propósito de estudiar el nivel de dulzura y la preferencia del producto. En ambos casos los yogures fueron comparados con productos tradicionales elaborados en línea en la empresa Milkaut S.A. En el yogur con sabor a vainilla se trabajó con la misma cantidad de sacarosa que la empleada en el yogur de línea (10% p/v) y en el producto sabor a frutilla se redujo dicho edulcorante en un 25%.

#### IV.2.1.2 Protocolo de elaboración

Se empleó el procedimiento descrito en la sección 2.2 del Capítulo III.

Para las elaboraciones de yogur de 30 litros se utilizó el equipamiento que se muestra en la **Figura IV.1**, el cual dispone de dos tinas doble camisa de 50 litros de capacidad cada una, que operan en paralelo.



**Figura IV. 1:** Equipamiento utilizado para las elaboraciones de yogur a escala piloto de 30 L.

Se tomaron muestras en diferentes momentos durante el proceso de fermentación (0, 45 y 150 min y al final de la elaboración) y durante el almacenamiento (1, 7, 14, 21 y 28 días) para analizar pH, acidez titulable, sinéresis, concentración de lactosa y GOS y perfiles de

ácidos orgánicos y de compuestos aromáticos. El recuento de bacterias totales y de probiótico se realizó al día siguiente de la elaboración y a los 21 días de almacenamiento refrigerado, mientras que el análisis de hongos y levaduras se llevó a cabo a los 21 días. A los 7 días se realizó un análisis sensorial descriptivo con panel entrenado y de aceptabilidad con consumidores y se analizó de composición global (grasa, sólidos totales y proteínas totales).

Para las elaboraciones de yogur de 100 litros se empleó la tina doble camisa que se muestra en la **Figura IV.2**. La adición de colorante, rojo carmín de cochinilla (Adicol S. A., Argentina) y saborizante: frutilla o vainilla (Givaudan-Roure, Argentina), según corresponda, fueron llevados a cabo al inicio del proceso de enfriamiento del yogur. A los 7 días de almacenamiento, se determinó lactosa, pH, acidez titulable y se realizó un análisis de preferencia con un panel entrenado.



**Figura IV. 2:** Equipamiento utilizado para las elaboraciones de yogur a escala piloto de 100 L.

#### IV.2.1.3 Determinaciones analíticas

Los análisis de pH, acidez titulable, sinéresis y composición global se realizaron según las técnicas descritas en la sección 2.3 del Capítulo II. Los recuentos microbiológicos, y análisis de perfiles de carbohidratos y de ácidos orgánicos se llevaron a cabo según lo descrito en la sección 2.3 del Capítulo III.

##### ✓ *Aislamiento de los compuestos de aroma*

El aislamiento de los compuestos volátiles se realizó por HS-SPME (*headspace* estático-microextracción en fase sólida). Esta técnica se basa en la utilización de fibras de diferentes materiales adsorbentes y/o absorbentes que retienen los compuestos volátiles presentes en el espacio de cabeza (*headspace*) de una muestra contenida en un recipiente sellado. La separación, identificación y cuantificación de los compuestos volátiles se

efectuó por cromatografía gaseosa acoplada a un detector de ionización de llama y a un espectrómetro de masas (GC-FID/MS).

Para llevar a cabo el aislamiento de los compuestos se realizó una suspensión de 5 g de yogur y 5 g de una solución saturada de ClNa que se transfirieron a un vial de vidrio de 30 mL de capacidad, el cual fue herméticamente cerrado empleando un tapón de butilteflon y un precinto de aluminio. El recipiente se colocó en un baño de agua termostatzado a 45 °C y luego de un tiempo de equilibrio de 10 min se introdujo una fibra Car/PDMS 75 µm (Supelco, Bellafonte, Inc., USA), la cual se expuso al *headspace* durante 30 min. El tipo de fibra y las condiciones de preparación de la muestra y de tiempo/temperatura de exposición de la fibra fueron previamente optimizados (Lazzarino, 2013).

Luego de transcurridos los 30 min, la fibra fue retirada y los compuestos volátiles retenidos fueron desorbidos térmicamente (modo *splitless*) en el puerto de inyección de un GC (Perkin Elmer Model 9000, USA) acoplado a un FID. La desorción se realizó por 5 min a 250 °C y los compuestos fueron separados en una columna HP-Innowax 60 m x 0,25 mm x 0,25 µm (Agilent Technologies J&W, USA) empleándose el siguiente programa de temperatura del horno: 45 °C (4 min), 5 °C/min hasta 150 °C (3 min), 10 °C/min hasta 250 C (5 min). La temperatura del detector se programó a 290 °C. Como gas carrier se empleó H<sub>2</sub> (2 mL/min).

La identificación de los picos se realizó calculando los índices de retención lineal (LRI) de los compuestos y comparándolos con valores de bibliografía.

Para confirmar la presencia de los compuestos tentativamente identificados en los perfiles cromatográficos obtenidos por CG-FID, las muestras se analizaron por GC-MS utilizando un GC Varian CP-3800 acoplado a un MS Varian Saturn 2000 (CCT, Santa Fe).

Las condiciones de muestreo por SPME y de desorción de los compuestos fueron las mismas que las empleadas en el análisis por GC-FID. La separación de los analitos se realizó en una columna VF-5ht, 30m x 0,25 mm x 0,10 µm. La línea de transferencia se mantuvo a 250 °C. Las condiciones operativas del MS fueron: Ionización por impacto electrónico a 70 eV; rango de adquisición de fragmentos: 40 a 350 amu; velocidad de escaneo: 0.50 scan/s. Como gas carrier se empleó He (1 mL/min). Para la identificación de los picos los espectros de los compuestos fueron comparados con la librería de espectros del software (NIST98, USA).

Los picos identificados por GC-FID y confirmados por GC-MS fueron integrados, promediados y expresados en unidades arbitrarias de áreas.

✓ **Análisis sensorial**

En los yogures preparados a escala de 30 L se realizó una evaluación sensorial descriptiva cuantitativa que estuvo dirigido por el grupo de análisis sensorial del Instituto de Tecnología de Alimentos (ITA/FIQ). Para ello, en una sala ambientada al efecto, iluminada con luz día, 8 panelistas entrenados en la metodología de trabajo evaluaron los yogures a los 7 días de elaborados. Las muestras fueron presentadas al panel de evaluadores identificadas con números aleatorios. Las evaluaciones se realizaron por duplicado y se utilizaron escalas no estructuradas de 10 cm, ancladas en 1 y 9. Los descriptores de textura evaluados fueron: consistencia (1 = forma hilo que penetra dejando hueco que se cierra inmediatamente, 9 = cae en bloque y se hunde parcialmente), cremosidad y aspereza (1 = casi nada, 9 = mucho). Para la evaluación de la intensidad del flavor se utilizó una escala de cinco puntos, desde “apenas perceptible” a “extremadamente perceptible”. Los descriptores fueron: gusto (dulce y ácido), sabor (a crema y a leche en polvo), sensación trigeminal (astringencia). Paralelamente se realizó un ensayo de aceptabilidad con 112 consumidores, utilizándose una escala hedónica de 9 grados, desde “Me gusta muchísimo” a “Me disgusta muchísimo” (ISO-8589, 1988). A continuación se muestra un ejemplo de la planilla entregada a cada consumidor:

<b>Aceptabilidad de yogur reducido en lactosa</b>		Fecha:.....	
Nombre y Apellido:.....		Edad:.....	
<p>Ud. Recibe tres muestras de yogur. En la primera fila coloque el número que le corresponde a cada muestra. A continuación, saboree cuidadosamente las mismas e indique su grado de gusto.</p>			
<b>Grado de gusto</b>	<b>Muestras</b>		
	352	584	196
Me gusta muchísimo			
Me gusta mucho			
Me gusta moderadamente			
Me gusta poco			
Me resulta indiferente			
Me disgusta poco			
Me disgusta moderadamente			
Me disgusta mucho			
Me disgusta muchísimo			
<p>Indique el/los atributos que definen su grado de aceptabilidad:</p> <p>.....</p> <p>.....</p>			

En los yogures elaborados a escala de 100 L se realizó un ensayo de preferencia por comparación con un yogur tradicional elaborado en la industria láctea Milkaut S. A. La prueba se realizó con un total de 30 panelistas (10 femeninos y 20 masculinos, rango de edades 30 – 50 años), pertenecientes a la mencionada empresa, quienes están familiarizados en análisis sensorial de yogur. Las muestras fueron evaluadas a los 7 días de almacenamiento. Como parte del test se consultó a los panelistas sobre las razones de su elección (Meilgaard y col., 2007).

<b>Preferencia de yogur reducido en lactosa</b>	Fecha:.....
Nombre y Apellido:.....	Edad:.....
Por favor pruebe el yogur a su izquierda primero. Luego pruebe el yogur a su derecha.	
Marque una sola de las frases con una cruz.	
<input type="checkbox"/> Prefiero la muestra 364	
<input type="checkbox"/> Prefiero la muestra 982	
<input type="checkbox"/> Me gustan las dos por igual	
Por favor comente las razones de su elección.	
.....	
.....	

✓ **Análisis estadístico**

Para los resultados de la evaluación sensorial de los descriptores de textura (consistencia, cremosidad y aspereza), astringencia y de los compuestos de aroma se calcularon los promedios y desviación estándar y se analizaron por ANOVA de una vía, utilizando el modelo lineal general y comparando las medias con el método de la mínima diferencia significativa (LSD) con un 95% de confianza. Se empleó el software SPSS 10.0 (SPSS Inc, Chicago, USA). Para cada uno de los descriptores de flavor y para el ensayo de aceptabilidad se utilizó el promedio ponderado.

**IV.2.2 Resultados de los yogures elaborados a escala de 30 L**

Los resultados obtenidos de composición global, recuentos microbiológicos, sinéresis, perfiles de carbohidratos y de ácidos orgánicos fueron similares a los presentados en los Capítulos precedentes. A continuación, se describen los mismos brevemente.

Los valores de composición global se muestran en la **Tabla IV.2**. El contenido de materia grasa fue de 2,5 – 2,6%, los sólidos totales estuvieron en el rango de 20,1 a 21,8% y los porcentajes de proteína oscilaron entre 4,06 y 4,26%. La inclusión de la enzima y del probiótico y prebiótico no produjo modificaciones en ninguno de estos parámetros. Los valores fueron adecuados y estuvieron de acuerdo a lo establecido por el CAA (CAAa, 2010).

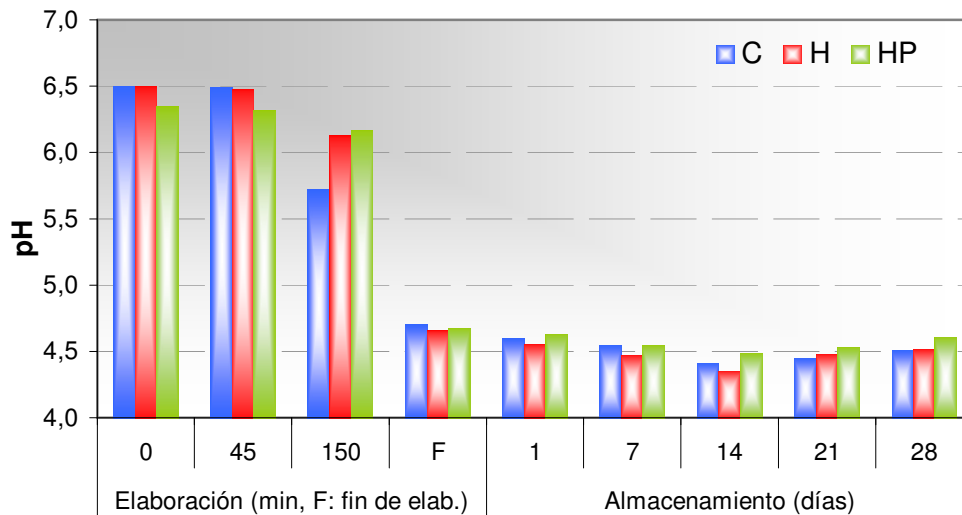
**Tabla IV. 2:** Composición global de los yogures.

<b>Muestra</b>	<b>Materia Grasa</b>	<b>Sólidos totales</b>	<b>Proteínas</b>
<b>C</b>	2,6 ± 0,1	20,10 ± 0,09	4,26 ± 0,07
<b>H</b>	2,5 ± 0,2	21,81 ± 0,07	4,06 ± 0,03
<b>HP</b>	2,6 ± 0,1	21,60 ± 0,03	4,11 ± 0,04

El recuento de bacterias del cultivo starter fue de  $10^9$  UFC/g para los yogures frescos control (**C**) e hidrolizados sin prob/preb (**H**), y se mantuvo hasta los 21 días de almacenamiento, mientras que para el yogur hidrolizado con prob/preb (**HP**) fue de  $10^8$  UFC/g y disminuyó un orden a los 21 días. El recuento del probiótico se mantuvo en  $10^7$  UFC/g hasta los 21 días. Los recuentos de hongos y levaduras en todos los productos se encontraron en niveles inferiores a 10 UFC/g.

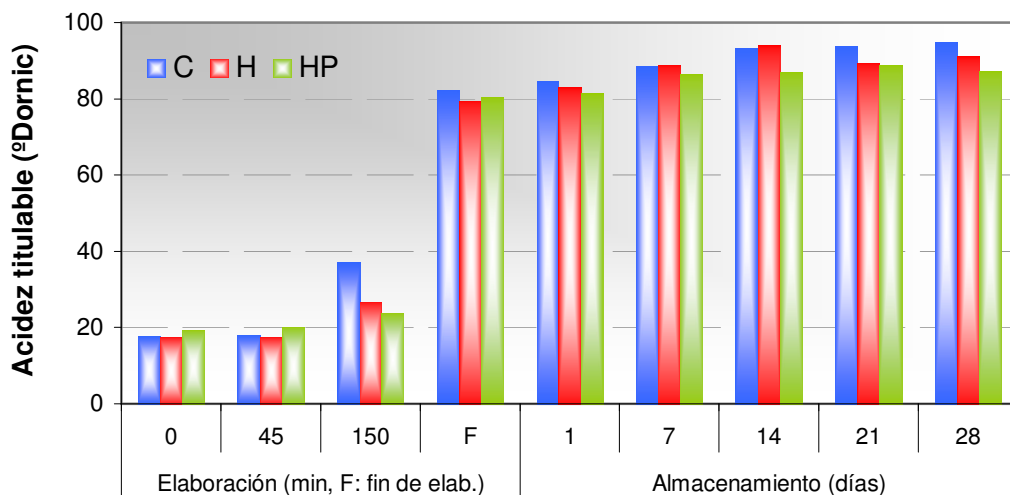
El porcentaje de sinéresis se incrementó a lo largo del almacenamiento en todos los productos aunque se mantuvieron en valores bajos; los yogures **C** y **H** alcanzaron 1 mL/100 mL mientras que el yogur **HP** alcanzó un valor de 4 mL/100 mL a los 28 días.

La evolución del pH de los yogures se puede observar en la **Figura IV.3**. A los 150 min de incubación los productos hidrolizados presentaron mayores valores de pH que el control, lo que se reflejó en un mayor tiempo de fermentación (de 30 min aprox.). Durante el almacenamiento los valores de postacidificación fueron muy bajos, 0,07, 0,14 y 0,19 unidades de pH, para los yogures **HP**, **H** y **C**, respectivamente.



**Figura IV. 3:** Evolución del pH de yogures durante la elaboración y el almacenamiento (5 °C/28 d).

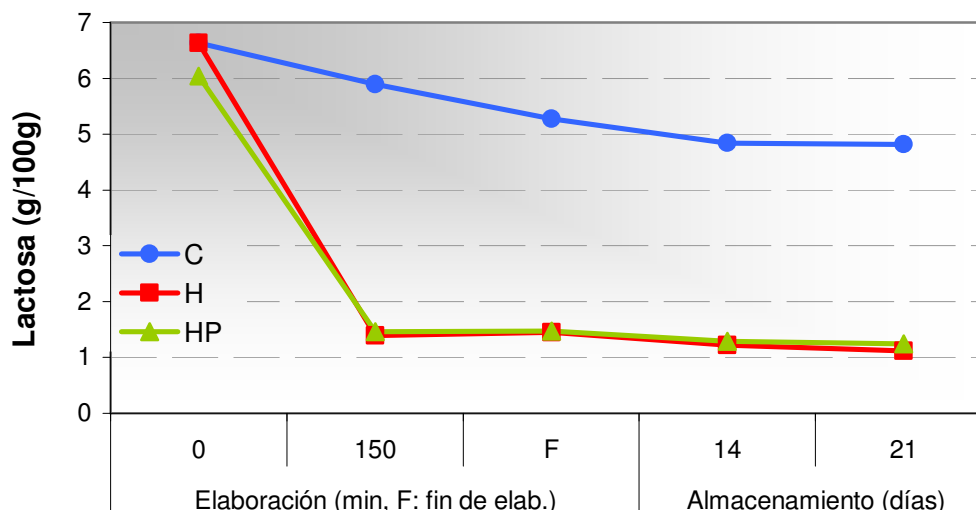
Como era esperable, la acidez titulable siguió un comportamiento inverso al pH (**Fig. IV.4**). Tanto a los 150 min de elaboración como luego de 21 días de almacenamiento refrigerado, el yogur C presentó mayor valor de acidez que los hidrolizados.



**Figura IV. 4:** Evolución de la acidez titulable de yogures durante la elaboración y el almacenamiento (5 °C/28 d).

En la **Figura IV.5** se observa la evolución de la lactosa durante la elaboración y almacenamiento.

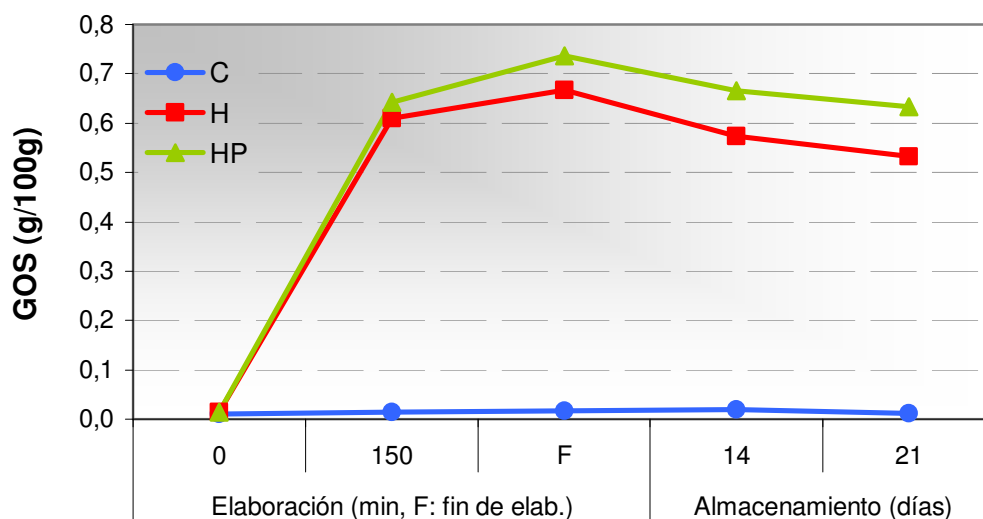




**Figura IV. 5:** Concentración de lactosa de yogures durante la elaboración y el almacenamiento (5 °C/21 d).

En los yogures hidrolizados las concentraciones de lactosa disminuyeron bruscamente desde 6,64 y 6,04 g/100 g hasta 1,39 y 1,47 g/100 g durante los primeros 150 min de elaboración y luego continuaron disminuyendo ligeramente hasta 1,12 y 1,24 g/100 g a los 21 días para los yogures **H** y **HP**, respectivamente. No se percibieron diferencias por la adición del probiótico y prebiótico. El yogur control mostró una disminución progresiva de este disacárido, alcanzando un valor de 4,8 g/100 g al día 21.

La evolución de la formación de GOS durante la elaboración y almacenamiento se observa en la **Figura IV.6**. La concentración de este grupo de compuestos se fue incrementando durante la elaboración, alcanzando los máximos valores de 0,67 y 0,74 para los yogures hidrolizados **H** y **HP**, respectivamente. Los valores disminuyeron ligeramente durante el almacenamiento hasta 0,53 y 0,63, respectivamente. Los yogures con adición de prob/preb presentaron valores levemente mayores que los productos sin la incorporación de los mismos.



**Figura IV. 6:** Concentración de GOS de yogures durante la elaboración y el almacenamiento (5 °C/21 d).

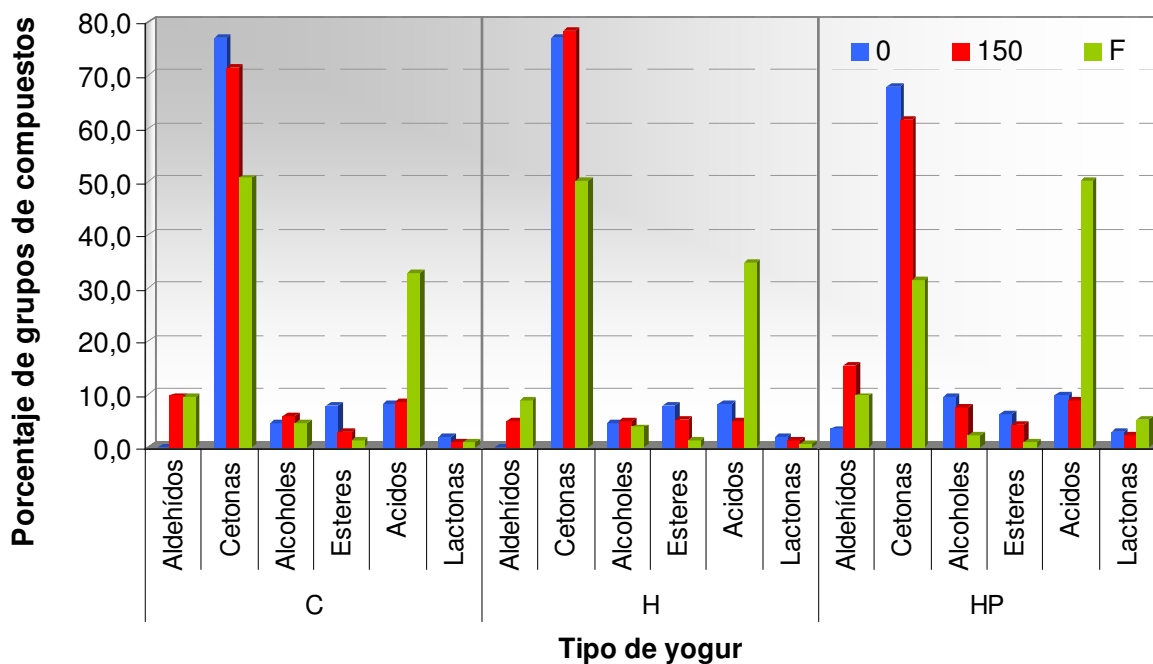
En la **Tabla IV.3** se observan las concentraciones de los ácidos orgánicos analizados al final de la elaboración y a los 21 días. La evolución y los valores de los diferentes ácidos analizados fueron similares a los reportados en los Capítulos anteriores.

**Tabla IV. 3:** Concentración de ácidos orgánicos (mg/100 g) de los yogures.

Ácido orgánico	Tiempo	Tipo de yogur		
		C	H	HP
<b>Láctico</b>	F	733,05	801,31	782,03
	21	895,23	843,18	835,32
<b>Butírico</b>	F	4,04	4,03	4,46
	21	10,59	8,94	11,48
<b>Cítrico</b>	F	217,96	234,05	238,57
	21	207,98	214,63	210,46
<b>Hipúrico</b>	F	1,90	2,12	1,72
	21	1,38	1,03	0,57
<b>Orótico</b>	F	9,63	11,15	11,15
	21	9,78	8,92	9,77

#### IV.2.2.1 Compuestos volátiles

Se identificaron un total de 20 compuestos volátiles en los yogures analizados (1 aldehído, 1 lactona, 2 ésteres, 3 alcoholes, 5 ácidos y 8 cetonas). En una primera instancia, la evolución de los perfiles de volátiles durante la elaboración se analizó considerando los diferentes grupos químicos en que fueron clasificados los componentes (**Fig. IV.7**).



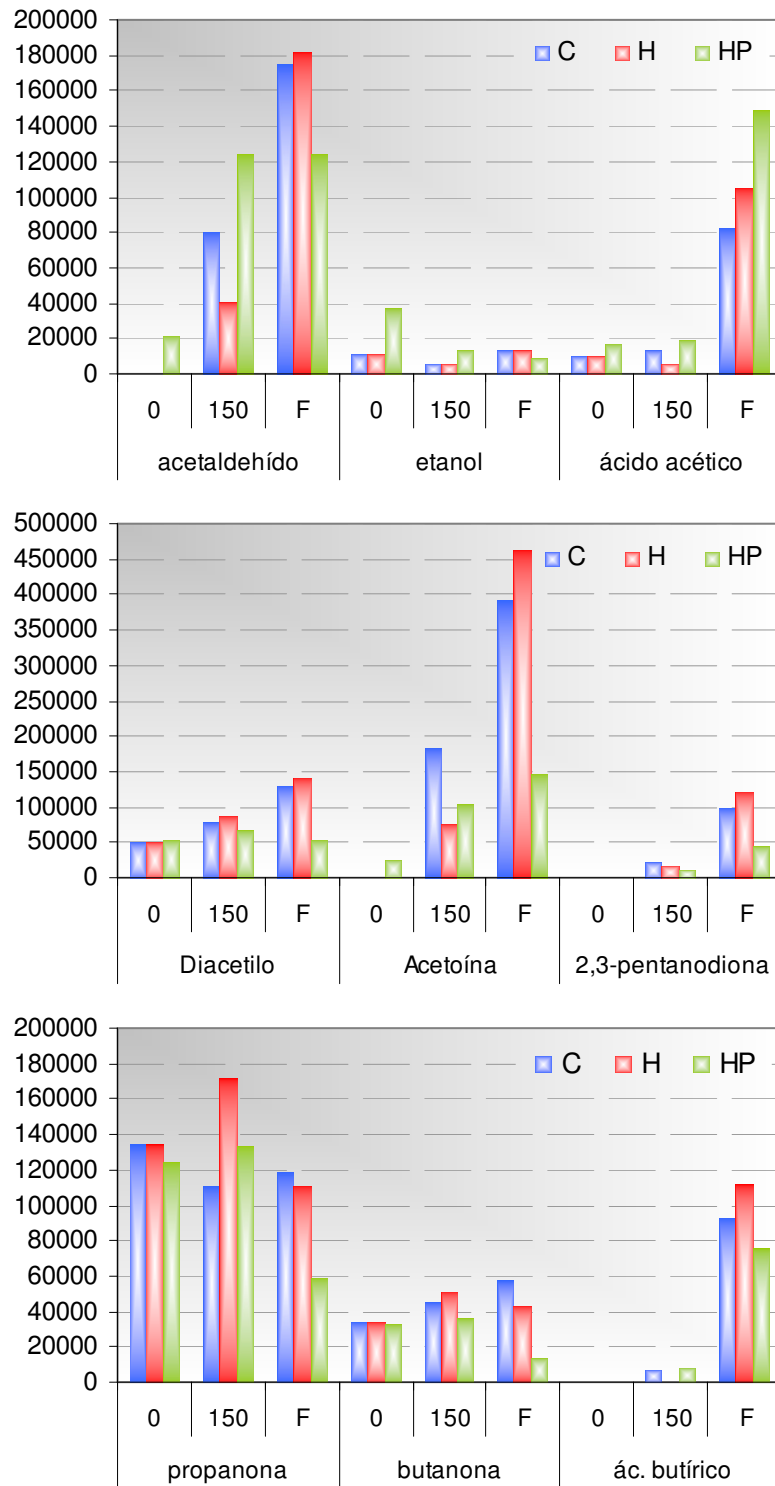
**Figura IV. 7:** Composición de la fracción volátil de los yogures durante la elaboración, considerando los diferentes grupos químicos de compuestos.

Como se observa en la figura, al comienzo de la fermentación el perfil de compuestos para las mezclas de leche de partida se caracterizó por un claro predominio de aquellos pertenecientes al grupo de las cetonas (en torno al 70%), siendo los restantes grupos minoritarios. A los 150 min, el perfil se modificó ligeramente: los compuestos del grupo de las cetonas continuaron siendo los mayoritarios; los aldehídos mostraron un particular incremento en los yogures **HP** y **C** y se observó además una disminución en la proporción del grupo de los ésteres en los tres yogures. Al final del proceso de fermentación, el perfil de volátiles cambió sustancialmente: las cetonas y los ácidos fueron los grupos preponderantes en todos los productos, siendo las cetonas mayoritarias en los yogures **C** y **H**, y los ácidos los compuestos que alcanzaron las mayores proporciones en los yogures **HP**; los aldehídos fueron el tercer grupo en abundancia, alcanzando similares porcentajes

en los tres tipos; de los restantes grupos de compuestos, las lactonas mostraron un importante incremento en el yogur **HP**.

Estos resultados muestran groseramente que al final de la fermentación la fracción volátil del yogur **HP** tuvo algunas diferencias respecto a los yogures **C** y **H**.

La evolución de los compuestos individuales, permite un mejor análisis de los cambios producidos durante la fermentación, en la **Figura IV.8** se muestra a modo de ejemplo la evolución de los principales compuestos volátiles durante la elaboración de los distintos yogures. Además, en la **Tabla VI.4** se listan los compuestos volátiles identificados con sus respectivos valores de áreas, obtenidos durante la elaboración.



**Figura IV. 8:** Evolución de los principales compuestos volátiles en los yogures. Se muestran los valores de áreas (en unidades arbitrarias) de las leches de partida (0), a los 150 min y final de elaboración (F).

**Tabla IV. 4:** Valores de áreas (en unidades arbitrarias) de los distintos compuestos volátiles identificados durante la fermentación de los yogures control (C) e hidrolizados sin y con probiótico y prebiótico (H y HP, respectivamente). En negrita se han resaltado aquellos compuestos derivados del metabolismo de la lactosa y/o de incidencia en el flavor.

COMPUESTOS	0 min			150 min			Final de elaboración		
	C	H	HP	C	H	HP	C	H	HP
<b>acetaldehído</b>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	20944 <sup>a</sup>	79960 <sup>b</sup>	40485 <sup>c</sup>	123878 <sup>a</sup>	175062 <sup>a</sup>	182050 <sup>a</sup>	124250 <sup>b</sup>
<b>propanona</b>	134088	134088	124302	110856 <sup>c</sup>	172254 <sup>a</sup>	133764 <sup>b</sup>	118546 <sup>a</sup>	110667 <sup>a</sup>	58295 <sup>b</sup>
<b>butanona</b>	33498	33498	33016	45701 <sup>a</sup>	51195 <sup>a</sup>	36604 <sup>b</sup>	57231 <sup>a</sup>	43452 <sup>b</sup>	13502 <sup>c</sup>
<b>etanol</b>	11016 <sup>b</sup>	11016 <sup>b</sup>	36901 <sup>a</sup>	5167 <sup>b</sup>	5189 <sup>b</sup>	14112 <sup>a</sup>	13758 <sup>a</sup>	13472 <sup>a</sup>	8635 <sup>b</sup>
<b>diacetilo</b>	49771	49771	54160	79780 <sup>ab</sup>	87559 <sup>a</sup>	68636 <sup>b</sup>	131142 <sup>b</sup>	140644 <sup>a</sup>	52430 <sup>c</sup>
Butanoato de etilo	13177	13177	13546	16335 <sup>b</sup>	25218 <sup>a</sup>	10937 <sup>c</sup>	14882 <sup>a</sup>	13784 <sup>a</sup>	8330 <sup>b</sup>
<b>2,3-pentanodiona</b>	nd	nd	nd	21642 <sup>a</sup>	17904 <sup>b</sup>	10719 <sup>c</sup>	99444 <sup>b</sup>	121357 <sup>a</sup>	44714 <sup>c</sup>
2-hexanona	51936 <sup>a</sup>	51936 <sup>a</sup>	35941 <sup>b</sup>	28546 <sup>b</sup>	43330 <sup>a</sup>	16494 <sup>c</sup>	17393 <sup>b</sup>	30658 <sup>a</sup>	19121 <sup>b</sup>
2-heptanona	78458 <sup>b</sup>	78458 <sup>b</sup>	94731 <sup>a</sup>	81720 <sup>b</sup>	143085 <sup>a</sup>	87308 <sup>b</sup>	75726 <sup>a</sup>	67515 <sup>a</sup>	34582 <sup>b</sup>
Hexanoato de etilo	25331	25331	23476	9089 <sup>c</sup>	16624 <sup>b</sup>	23481 <sup>a</sup>	10008 <sup>a</sup>	12155 <sup>a</sup>	5000 <sup>b</sup>
1-pentanol	11846 <sup>b</sup>	11846 <sup>b</sup>	20392 <sup>a</sup>	23636 <sup>a</sup>	16680 <sup>b</sup>	28414 <sup>a</sup>	26161 <sup>a</sup>	19503 <sup>b</sup>	8504 <sup>c</sup>
<b>acetoína</b>	nd <sup>b</sup>	nd <sup>b</sup>	26719 <sup>a</sup>	184036 <sup>a</sup>	75087 <sup>b</sup>	103372 <sup>b</sup>	392350 <sup>b</sup>	462957 <sup>a</sup>	147660 <sup>c</sup>
1-hexanol	nd	nd	nd	21053	17596	17840	43819 <sup>a</sup>	44488 <sup>a</sup>	13489 <sup>b</sup>
2-nonanona	29352 <sup>b</sup>	29352 <sup>b</sup>	35647 <sup>a</sup>	35788	31356	35970	37152	37780	31621
<b>ác. acético</b>	10189 <sup>b</sup>	10189 <sup>b</sup>	16884 <sup>a</sup>	13924 <sup>b</sup>	6066 <sup>c</sup>	19048 <sup>a</sup>	82387 <sup>b</sup>	105480 <sup>b</sup>	149447 <sup>a</sup>
<b>ác. butírico</b>	nd	nd	nd	6836 <sup>b</sup>	nd <sup>c</sup>	8116 <sup>a</sup>	93143 <sup>ab</sup>	111557 <sup>a</sup>	75311 <sup>b</sup>
<b>ác. hexanoico</b>	6157	6157	7429	12075 <sup>a</sup>	6105 <sup>b</sup>	8465 <sup>b</sup>	230741 <sup>b</sup>	266595 <sup>a</sup>	198072 <sup>b</sup>
ác. octanoico	9899	9899	13144	17974 <sup>a</sup>	11954 <sup>ab</sup>	14500 <sup>b</sup>	142106	161309	147414
ác. decanoico	13840 <sup>b</sup>	13840 <sup>b</sup>	20817 <sup>a</sup>	20037 <sup>a</sup>	15635 <sup>b</sup>	21276 <sup>a</sup>	52181 <sup>b</sup>	58577 <sup>ab</sup>	71097 <sup>a</sup>
δ-dodecalactona	10583 <sup>b</sup>	10583 <sup>b</sup>	17609 <sup>a</sup>	8556 <sup>b</sup>	9944 <sup>b</sup>	17998 <sup>a</sup>	20619 <sup>b</sup>	14629 <sup>c</sup>	68131 <sup>a</sup>

nd: no detectado. Los valores con diferente superíndice dentro de la misma fila y tiempo de análisis indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

El **acetaldehído** resultó un compuesto mayoritario en los tres productos. En los yogures **C** y **H** el nivel se incrementó sustancialmente durante la fermentación, mientras que el yogur **HP** mostró un incremento inicial y luego permaneció constante. Al final del proceso no se detectaron diferencias significativas entre los yogures **C** y **H**, pero el yogur **HP** presentó niveles significativamente menores ( $p < 0,05$ ).

Dentro del grupo de los alcoholes sólo se identificaron alcoholes primarios de cadena lineal: etanol, 1-pentanol y 1-hexanol. En los yogures **C** y **H**, el **etanol** mostró una disminución a los 150 min y luego un ligero aumento hacia el final de la fermentación, mientras que en el yogur **HP** presentó una disminución a lo largo de todo el proceso. En el caso del **1-pentanol** y del **1-hexanol**, los mismos tuvieron un ligero incremento durante la fermentación en los yogures **C** y **H**, mientras que en el yogur **HP**, luego de un aumento inicial, se produjo una disminución en los valores de las áreas. Al final de la fermentación, para los tres alcoholes primarios, se detectaron niveles significativamente mayores ( $p < 0,05$ ) en los yogures **C** y **H**, respecto al **HP**.

Dentro del grupo de las cetonas se identificaron metilcetonas (propanona, butanona, hexanona, heptanona, nonanona), dicetonas (2,3-butanodiona o diacetilo y 2,3-pentanodiona), e hidroxicetonas (3-hidroxi 2-butanona o acetoína). El **diacetilo** y su producto de reducción, **acetoína**, son considerados compuestos de enorme relevancia en el flavor del yogur. Ambos resultaron cuantitativamente importantes en los tres productos, pero principalmente en los yogures **C** y **H**, en los que se observó un notorio incremento durante la fermentación. En el caso del yogur **HP**, el diacetilo aumentó inicialmente su valor para luego disminuir, y la acetoína incrementó durante la elaboración. Al final del proceso, estos compuestos presentaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los yogures: los mayores niveles fueron para el yogur **H** y los menores para el **HP**.

La **2,3-pentanodiona** mostró un importante incremento en los tres yogures. Se detectaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre sus niveles a partir de los 150 min. Al final del proceso los mayores niveles fueron encontrados en el yogur **H** y los menores niveles en el yogur **HP**.

Las **metilcetonas** presentaron comportamientos diversos. Los yogures hidrolizados (**H** y **HP**) presentaron evoluciones similares. En general aumentaron a los 150 min y luego disminuyeron. Por su parte, en el yogur **C**, la butanona incrementó los niveles, la hexanona los disminuyó y las restantes metilcetonas permanecieron constantes. Para la mayoría de estos compuestos, los niveles encontrados fueron significativamente mayores ( $p < 0,05$ ) en los yogures **C** y **H**, respecto al **HP**.

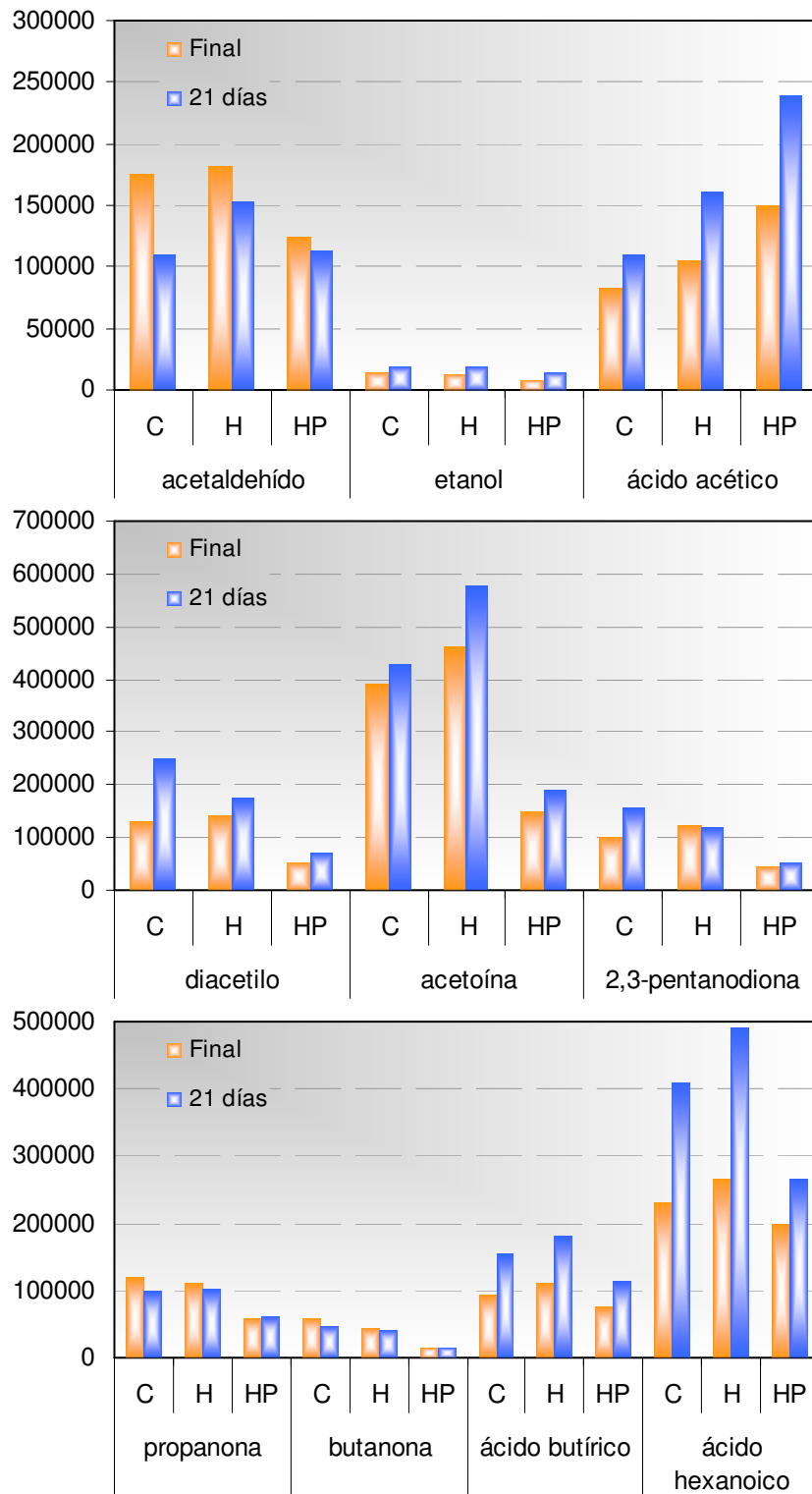
Los ésteres identificados fueron dos ésteres etílicos: el **butanoato de etilo** y **hexanoato de etilo**. Los niveles de butanoato de etilo disminuyeron ligeramente en el yogur **HP**, permanecieron constantes en el yogur **C** y aumentaron a los 150 min para luego disminuir en el yogur **H**. Por su parte, los niveles de hexanoato de etilo disminuyeron en los tres yogures. Al final de la fermentación, los productos **C** y **H** tuvieron cantidades significativamente mayores ( $p < 0,05$ ) que el yogur **HP**.

Dentro del grupo de los ácidos se identificaron ácidos lineales de número par de átomos de carbono: los **ácidos acético, butanoico, hexanoico, octanoico** y **decanoico**. En general el comportamiento de los mismos en los distintos yogures fue similar, presentando ligeras variaciones hasta los 150 min, para luego mostrar un fuerte incremento. Para la mayoría de los ácidos, los valores encontrados al final de la fermentación fueron mayores en los yogures **C** y **H**.

Globalmente se pudo observar que el comportamiento de la mayoría de los compuestos fue similar en los yogures **C** y **H**, en el caso del yogur **HP** los volátiles identificados mostraron una evolución diferente, con la excepción del grupo de los ácidos. También se pudo evidenciar que al final de la fermentación los niveles de los distintos compuestos fueron significativamente menores en el yogur **HP**, con la excepción del ácido acético que presentó en este producto una mayor cantidad.

Otro aspecto importante de analizar fueron los cambios cuantitativos que sufrieron los principales compuestos volátiles de relevancia en el flavor global durante el almacenamiento (**Fig. IV.9**) y los niveles que alcanzaron a los 21 días a fin de detectar diferencias entre los distintos productos (**Tabla IV.5**).





**Figura IV. 9:** Valores de áreas (en unidades arbitrarias) de los principales compuestos volátiles en los yogures al final de la elaboración y 21 días.

El acetaldehído presentó una disminución en los niveles en los yogures **C** y **H**, permaneciendo constante en el yogur **HP**. Por su parte, un aumento en los niveles de etanol, producto de reducción del acetaldehído se evidenció en los tres yogures.

Dentro de las cetonas, los niveles de la propanona y butanona presentaron ligeras variaciones en los tres yogures. Las dicetonas 2,3-butanodiona y 2,3-pentanodiona mostraron en general los mayores incrementos en el yogur **C** y en menor medida en el yogur **HP**. En el caso de la 3-hidroxi 2-butanona o acetoina, los mayores incrementos se observaron en el yogur **H**, y en menor medida en los yogures **C** y **HP**.

Los ácidos acético, butírico y hexanoico incrementaron los niveles en todos los productos. En particular, el incremento del ácido acético resultó más notorio en el yogur **HP**.

**Tabla IV. 5:** Valores de áreas (en unidades arbitrarias) de los compuestos volátiles identificados en los yogures a los 21 días de almacenamiento.

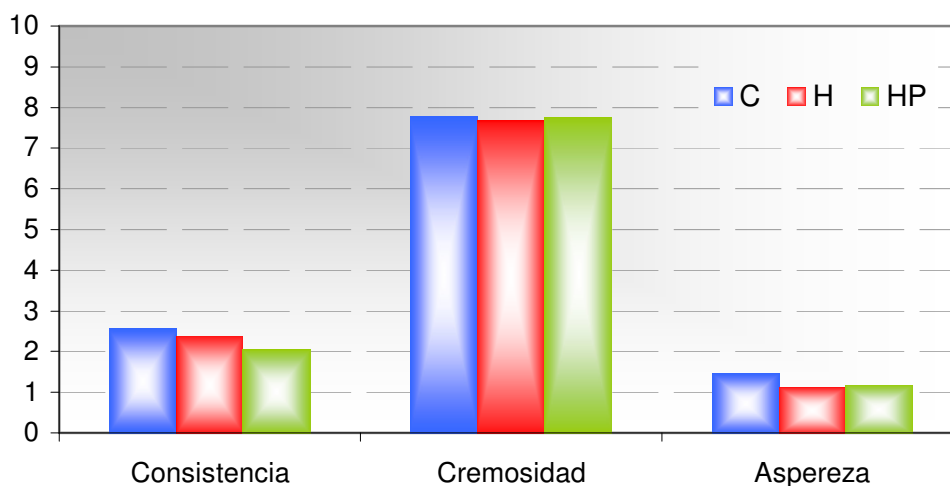
COMPUESTOS	Tipo de yogur		
	C	H	HP
acetaldehído	109389 <sup>b</sup>	153714 <sup>a</sup>	112560 <sup>b</sup>
2-propanona	99955 <sup>a</sup>	100928 <sup>a</sup>	62335 <sup>b</sup>
2-butanona	45598 <sup>a</sup>	39746 <sup>b</sup>	14664 <sup>c</sup>
etanol	19318 <sup>a</sup>	19864 <sup>a</sup>	14809 <sup>b</sup>
diacetilo	248133 <sup>a</sup>	174676 <sup>b</sup>	70841 <sup>c</sup>
butanoato de etilo	17245 <sup>a</sup>	13684 <sup>b</sup>	9000 <sup>c</sup>
2,3-pentanodiona	156928 <sup>a</sup>	118702 <sup>b</sup>	52476 <sup>c</sup>
2-hexanona	42343 <sup>a</sup>	34738 <sup>b</sup>	23130 <sup>c</sup>
2-heptanona	76081 <sup>a</sup>	66353 <sup>b</sup>	36104 <sup>c</sup>
hexanoato de etilo	15003 <sup>a</sup>	10336 <sup>b</sup>	nd <sup>c</sup>
1-pentanol	28291 <sup>a</sup>	20711 <sup>b</sup>	10313 <sup>c</sup>
acetoina	428725 <sup>b</sup>	576966 <sup>a</sup>	189083 <sup>c</sup>
1-hexanol	41701 <sup>a</sup>	44545 <sup>a</sup>	15148 <sup>b</sup>
2-nonanona	35463 <sup>a</sup>	33782 <sup>a</sup>	25947 <sup>b</sup>
ácido acético	110310 <sup>c</sup>	160649 <sup>b</sup>	238737 <sup>a</sup>
ácido butírico	155069 <sup>b</sup>	180716 <sup>a</sup>	113101 <sup>c</sup>
ácido hexanoico	408256 <sup>b</sup>	492276 <sup>a</sup>	266113 <sup>c</sup>
ácido octanoico	193278 <sup>a</sup>	219371 <sup>a</sup>	151309 <sup>b</sup>
ácido decanoico	65487 <sup>b</sup>	86271 <sup>a</sup>	64115 <sup>b</sup>
δ-dodecalactona	14427 <sup>c</sup>	22675 <sup>b</sup>	44467 <sup>a</sup>

Los valores con diferente superíndice dentro de la misma fila indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Como se observa en la **Tabla IV.5**, más de la mitad de los compuestos volátiles presentaron diferencias significativas entre los distintos yogures, a saber: 2-butanona, diacetilo, butanoato de etilo, 2,3-pentanodiona, 2-hexanona, 2-heptanona, hexanoato de etilo, 1-pentanol, acetoína, ácido acético, ácido butírico, ácido hexanoico y  $\delta$ -decalactona. La mayoría de estos compuestos (2-butanona, diacetilo, butanoato de etilo, 2,3-pentanodiona, 2-hexanona, 2-heptanona, hexanoato de etilo, 1-pentanol) tuvieron mayores niveles en el yogur control. En el caso de la acetoína, ácido butírico y ácido hexanoico, los valores fueron superiores en el yogur **H** mientras que los niveles de ácido acético y  $\delta$ -dodecalactona resultaron mayores en el yogur **HP**. Por su parte, dos compuestos importantes en el flavor tales como acetaldehído y acetoína presentaron mayores niveles en el yogur **H**.

#### IV.2.2.2 Análisis sensorial

No hubo diferencias entre las muestras para las características de textura analizadas. El descriptor cremosidad, por el valor que presenta, definió la textura de este tipo de producto. La consistencia y la aspereza de los yogures hidrolizados formulados con probiótico/prebiótico (**HP**) y sin estos agregados (**H**), fueron de menor intensidad que para la muestra control, tal como se puede apreciar en la **Figura IV.10**.



**Figura IV. 10:** Descriptores de textura sensorial

En cuanto al flavor, el mismo está definido por gustos dulce y ácido + sabor a crema y a leche en polvo + astringencia (**Fig. IV.11**). En la figura se observa que no hubo diferencia entre las muestras en la intensidad percibida de la sensación trigeminal astringencia ni

tampoco del sabor a crema. En cambio, se observó diferencias respecto del control, en el descriptor sabor a leche en polvo, alcanzando valores superiores en un 40% para el yogur hidrolizado **H**, y en un 30% para el yogur **HP**. El gusto dulce de **H** aumentó 1,33 veces y el de **HP** 1,11 veces, mientras que el gusto ácido en **H** y **HP** disminuyó un 20% respecto del control. No se percibieron ni sabores extraños ni defectos.

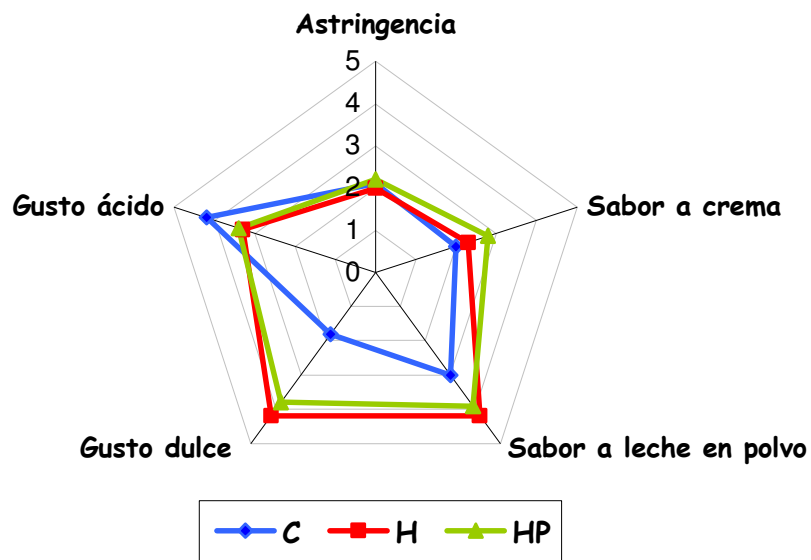


Figura IV. 11: Descriptores del flavor.

Los resultados del análisis de aceptabilidad se observan en la Figura IV.12.

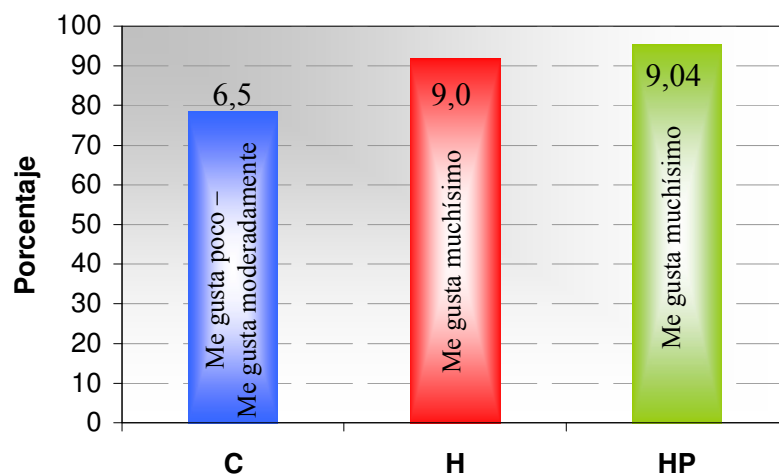


Figura IV. 12: Grados de gusto positivo.

El 95,5% de los consumidores manifestaron grados de gusto positivo para el yogur **HP**, el 91,9% para el yogur **H** mientras que sólo fue del 78,5% para el control. De este

porcentaje se obtuvo que los valores medios para los yogures **HP** y **H** fueron de 9,04 y 9,0, respectivamente, que corresponden a “Me gusta muchísimo” y para el control fue de 6,5 que corresponde a “Me gusta poco - Me gusta moderadamente”. La diferencia en el grado de gusto de las muestras de yogur hidrolizado sin y con prob/preb, respecto del control, se atribuye a que presentan menor intensidad del gusto ácido y mayor dulzor.

### IV.2.3 Resultados de los yogures elaborados a escala de 100 L

No se evidenciaron modificaciones durante la elaboración con respecto a lo reportado anteriormente para los yogures de 30 L.

Los parámetros medidos a los 7 días se muestran en la **Tabla IV.6**.

**Tabla IV. 6:** Parámetros medidos de los yogures.

Yogur saborizado	pH	Acidez titulable (°D)	Lactosa (g/100 g)
Vainilla	4,65	65,16	0,69
Frutilla	4,60	66,28	0,81

Los valores de pH y acidez titulable fueron similares a los obtenidos en las experiencias de laboratorio. La concentración de lactosa fue baja correspondiendo a porcentajes de hidrólisis de aproximadamente 85% en ambos casos. Del panel sensorial se arribaron a las siguientes conclusiones:

El yogur sabor vainilla deslactosado obtenido con la misma cantidad de sacarosa que el control, fue el preferido por el 80 % de los encuestados, aunque lo detectaron más dulce que el de línea.

Cuando se redujo la cantidad de sacarosa en un 25% en la elaboración del yogur sabor a frutilla, el 50% de los encuestados prefirieron el yogur hidrolizado y sólo el 53% lo encontró más dulce en comparación al de línea. Es decir, encontraron al yogur deslactosado igualmente aceptable que el yogur tradicional.

## IV.3 Elaboración de yogur a escala industrial

### IV.3.1 Materiales y métodos

#### IV.3.1.1 Diseño experimental

Se realizó una elaboración de yogur tipo bebible sabor frutilla empleando la tecnología intervenida, con 0,25 g/L de enzima y 8,75% de sacarosa, procesando un volumen de 4000

litros de leche. El mismo tipo de yogur fue elaborado empleando la tecnología tradicional, es decir, sin la incorporación de enzima y con 10% de sacarosa. El equipo industrial empleado se muestra en la **Figura IV.13**.



**Figura IV. 13:** Equipamiento utilizado para la elaboración de yogur a escala industrial de 4000 L.

El protocolo de fabricación fue el siguiente:

La leche fluida estandarizada, higienizada y pasteurizada a 72 °C durante 15 segundos presentaba las siguientes características:

Materia grasa: 3,03 g/100 g

Proteína total: 3,03 g/100 g

Lactosa: 4,69 g/100 g

Sólidos totales: 11,38 g/100 g

Sólidos no grasos: 8,36 g/100 g

Densidad: 1030 g/cm<sup>3</sup>

pH: 6,8 ( $\Omega$  Metrohm 691, Suiza)

Acidez: 13 °D

El proceso se inició con la preparación de la mezcla de 4000 L de leche fluida con 350 Kg de sacarosa (12,5% menos que la empleada habitualmente) en un tanque provisto de agitador vertical descentrado, incorporando la sacarosa a través de un mezclador de polvos. Las propiedades de la mezcla fueron las siguientes:

Materia grasa: 2,41 g/100 g

Proteína total: 2,93 g/100 g

Sólidos totales: 16,47 g/100 g

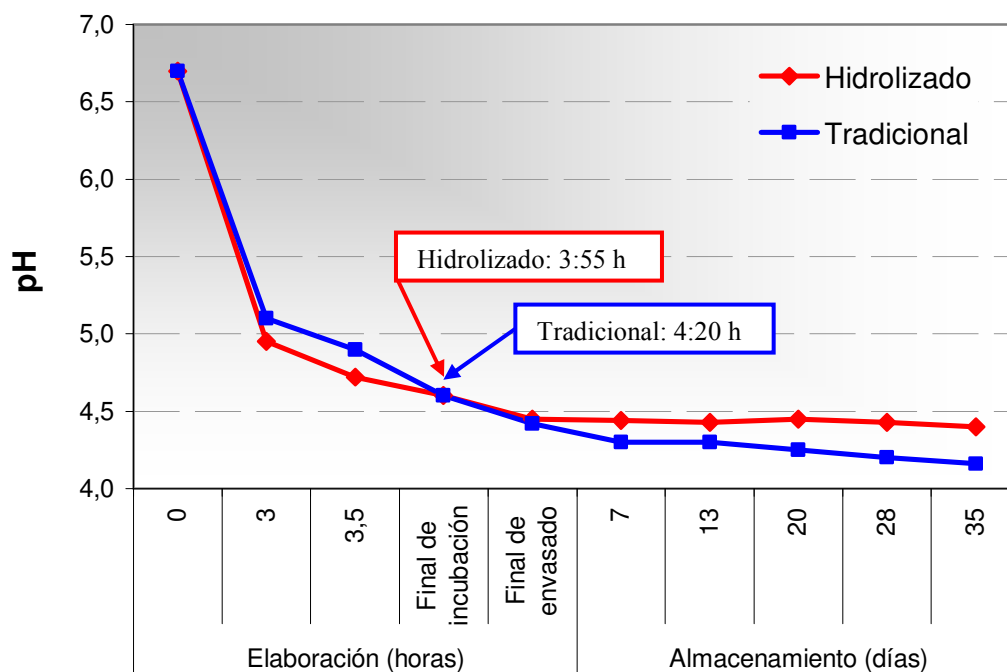
La mezcla se sometió a un tratamiento térmico en un pasteurizador a placas (92 °C/4 min), luego se homogeneizó (180 bar), se enfrió a 42,5 °C y se envió al tanque de fermentación provisto con agitador. El fermento congelado comercial compuesto por *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* YF-L702 (Chr Hansen, Quilmes, Argentina) se adicionó en línea (375 g) y se incorporó la enzima  $\beta$ -galactosidasa (1000 g) bajo agitación. Luego, se detuvo la agitación y se comenzó la incubación a 42 °C. Se realizaron controles de pH y cuando el mismo alcanzó el valor de 4,6 se comenzó la agitación del coágulo y se procedió al enfriamiento en un intercambiador a placas hasta 10 °C. Se adicionó el colorante rojo carmín de cochinilla y la esencia de frutilla y se procedió al envasado del mismo en bolsas plásticas de polietileno tricapa de 1 Kg. A los 7 días se evaluó la lactosa residual y además se realizaron mediciones de pH y acidez. Se efectuó un análisis sensorial de aceptabilidad general con un panel de consumidores familiarizados en análisis de yogur, para evaluar el efecto de la hidrólisis de la lactosa, durante el período de aptitud del mismo (35 días).

#### **IV.3.1.2 Determinaciones analíticas**

Los análisis de pH y acidez titulable se realizaron en la industria Milkaut S. A. La determinación de lactosa se llevó a cabo según la técnica detallada en la sección 2.3 del Capítulo II. La prueba de preferencia con el test de comparación de a pares se realizó según lo descrito en la sección 2.1.3 del presente Capítulo. El yogur hidrolizado empleando 0,25 g/L de enzima y 8,75% p/v de sacarosa se comparó con el yogur tradicional elaborado con 10% p/v de sacarosa. Los productos fueron evaluados periódicamente durante toda la vida útil (35 d).

#### **IV.3.2 Resultados**

Se observó una leve reducción en el tiempo de fermentación de aprox. 25 min en el yogur hidrolizado en comparación al tradicional (**Fig. IV.14**). Asimismo, se notó una menor postacidificación de 0,2 unidades de pH en el yogur hidrolizado en comparación a 0,44 observada para el tradicional, a los 35 días.



**Figura IV. 14:** Evolución del pH de yogures durante la elaboración y el almacenamiento (5 °C/35 d).

Durante el período de aptitud del yogur (35 días), la acidez titulable se mantuvo prácticamente sin cambios en 56 °D para el yogur hidrolizado, mientras que para el tradicional aumentó ligeramente desde 70 °D al final de la elaboración hasta 75 °D a los 35 días.

El contenido de lactosa residual en el producto hidrolizado a los 7 días resultó de 0,61 g/100 g, mientras que para el tradicional fue de 3,8 g/100 g.

El panel sensorial halló al yogur hidrolizado muy agradable durante toda la vida útil, levemente menos dulce y moderadamente más líquido que el yogur tradicional, probablemente debido a la reducción de sacarosa.

Por otro lado, el yogur deslactosado obtenido a escala industrial tuvo una ligera disminución en la viscosidad comparado al elaborado en planta piloto, lo que puede ser debido a que en el primer caso se aplica una agitación más intensa durante el enfriamiento y a las operaciones de transporte del producto durante el proceso de envasado.

#### IV.4 Discusión

En este Capítulo se validaron a escala piloto e industrial las variables estudiadas en pequeña escala. Por los satisfactorios resultados obtenidos se pudo verificar que las estrategias desarrolladas en laboratorio para la obtención de un yogur reducido en lactosa pudieron trasladarse exitosamente a mayor escala.



En particular se observaron algunos aspectos que se describen a continuación. Los yogures deslactosados elaborados a escala piloto tuvieron una demora en el tiempo de fermentación. Las características de pH, acidez titulable y composición global y los recuentos microbiológicos cumplieron con los límites establecidos en el CAA (CAAa, 2010), y fueron similares al control. Los valores de lactosa en los yogures recién elaborados a escala piloto oscilaron entre 1,46 y 0,69 g/100 g correspondiendo el mayor valor a los yogures batidos (con y sin prob/preb) y el menor a los yogures bebibles, y para el yogur bebible obtenido en la industria el valor fue ligeramente inferior, de 0,61 g/100 g; en todos los casos los porcentajes de hidrólisis fueron superiores al 75%. La adición de *L. acidophilus* La-5 y de inulina no produjeron modificaciones importantes en el proceso de hidrólisis de la lactosa con la enzima  $\beta$ -galactosidasa. Estos resultados fueron similares a los obtenidos para los yogures preparados a escala laboratorio de 5 L.

Los yogures batidos presentaron textura cremosa y poca consistencia, características de este tipo de yogur; no se encontraron diferencias entre el control y los hidrolizados con y sin prob/preb, lo que indica que los tratamientos propuestos no afectaron la textura. Los componentes de flavor tales como sabor a crema y sensación astringente no se vieron afectados. En cambio se percibió un efecto potenciador del sabor a leche en polvo. Hubo un importante desarrollo de gusto dulce lo que podría haber enmascarado el gusto ácido, razón por la cual se percibió con menor intensidad. Es importante remarcar que los yogures experimentales y el control fueron elaborados con la misma cantidad de sacarosa.

Con respecto a la fracción volátil, se identificaron muchos de los componentes que han sido reportados como claves en el flavor de yogur, a saber: acetaldehído, propanona, butanona, diacetilo, acetoína, 2,3-pentanodiona, etanol y ácido acético (Imhof y col., 1995; Ott y col., 1997; Schlichtherle-Cerny y Oberholzer, 2007; Cheng, 2010). En particular, los compuestos carbonilo harían la mayor contribución al aroma debido a las altas concentraciones en la que se encuentran presentes (Routray y Mishra, 2011).

El estudio de fracción volátil de los distintos yogures reveló cambios en los perfiles durante la fermentación, hecho esperado teniendo en cuenta que los compuestos volátiles son producidos por la actividad metabólica de los microorganismos del starter sobre los distintos constituyentes de la leche durante la elaboración del yogur o dentro de las primeras 24 horas de almacenamiento (Imhof y Bosset, 1994). Globalmente al final de este proceso el yogur control no presentó diferencias importantes respecto del hidrolizado sin prob/preb en cuanto a las proporciones de los distintos grupos de compuestos, aunque en este último se observó mayores valores de áreas en algunos compuestos tales como

diacetilo, acetoína y 2,3-pentanodiona, respecto al control. Por otra parte, diferencias cuantitativas (teniendo en cuenta las áreas de los compuestos) se detectaron para el yogur hidrolizado conteniendo probiótico y prebiótico. La característica más interesante que se observó en este caso fue la mayor producción de ácido acético y los menores niveles de los restantes compuestos. *L. acidophilus* ha mostrado producir cantidades variables de ácido acético durante la fermentación (Østlie y col., 2003). Estos resultados sugieren que la disminución del contenido de lactosa en los yogures hidrolizados no tiene un efecto significativo en el metabolismo de las bacterias lácticas, pero la presencia de bacterias probióticas y/o compuestos prebióticos parece afectar de alguna manera la producción de volátiles.

Los cambios observados durante el almacenamiento son debidos a reacciones bioquímicas que resultan en su formación o conversión a otros compuestos por enzimas bacterianas o pérdidas por volatilización (Cheng, 2010). En general comportamientos similares fueron encontrados entre los yogures. La disminución del acetaldehído, las variaciones mínimas en los niveles de propanona y butanona, y el incremento del diacetilo y del etanol observados durante el almacenamiento refrigerado ha sido también señalado por otros autores (Gaafar, 1992; Laye y col., 1993; Güler, 2007; Routray y Mishra, 2011). Por su parte, la producción de acetoína y su aumento durante el almacenamiento ha sido atribuida a la actividad de *S. thermophilus* (Xanthopoulos y col., 2001). En todos los yogures se observó el particular incremento en los niveles de los ácidos volátiles (C2-C6), lo cual ha sido reportado en distintos trabajos (Fernández-García y McGregor, 1994) incluyendo el estudio de yogures con la adición de bacterias probióticas (Donkor y col., 2006). Al final del periodo de conservación, la composición volátil mostró diferencias cuantitativas en los tres yogures, con los controles presentando los mayores valores de áreas para muchos de los compuestos identificados. Por su parte, los yogures hidrolizados con prob/preb tuvieron un mayor incremento en el área del ácido acético. Un significativo aumento en el contenido de ácido acético en yogures durante la etapa de almacenamiento ha sido reportado por distintos autores (Gaafar, 1992; Fernández-García y McGregor, 1994; Güler, 2007). Altos niveles de este compuesto puede impartir un sabor a vinagre, el cual no es aceptado por los consumidores (Cheng, 2010). Por lo tanto, la concentración de ácido acético es un parámetro que puede acortar la vida útil de yogur.

Los yogures deslactosados causaron un impacto positivo entre los consumidores consultados, a tal punto que tuvieron mayor grado de gusto con respecto al yogur control lo que se debió a su cremosidad, dulzor y baja acidez. De esta manera, se podría concluir que

es necesaria una reducción de sacarosa en los yogures hidrolizados para obtener productos comparables en el nivel de dulzura a los yogures tradicionales.

En las experiencias a escala industrial se observó una disminución en el tiempo de fermentación durante la manufactura del yogur deslactosado, a diferencia de lo detectado en las experiencias a escala laboratorio y piloto, que puede ser atribuido a que el starter utilizado fue diferente. Sin embargo, los restantes parámetros no se vieron afectados en comparación a los obtenidos en las experiencias a menor escala. Se verificó una reducción superior al 80% en el contenido de lactosa, y se observó una menor postacidificación con cambios despreciables en la textura. La calidad general y la vida útil fueron comparables a la del yogur tradicional. Este hecho se debió a que en el yogur deslactosado se empleó menos sacarosa en relación al control, de manera de tratar de lograr un nivel de dulzura equivalente. Este aspecto es de considerar cuando se realiza un balance de costos en la elaboración de yogures modificados en su contenido de lactosa por vía enzimática; si bien se tiene un incremento de costo por el uso de enzima, se tiene una disminución de costo por el empleo de menor cantidad de sacarosa.

Los resultados reportados en bibliografía relacionados a la calidad sensorial de yogures deslactosados son variables. Es conveniente aclarar que esta variabilidad puede ser atribuida a múltiples factores como ser: el tipo de yogur elaborado, el grado de hidrólisis alcanzado, el tipo de enzima y los ingredientes/aditivos empleados, entre otros. Ismail y col. (1983) realizaron análisis sensorial a yogures deslactosados obtenidos en dos condiciones: elaborados con leche pre-hidrolizada (con distinto grado de hidrólisis: 12,5; 25 y 50%) y adicionando simultáneamente la enzima (en distintas dosis) con el fermento. En el primer caso, los yogures con distintos grados de hidrólisis fueron similares y recibieron mayores puntajes para el flavor, textura y consistencia en comparación al control, y no encontraron diferencias en el dulzor. En el segundo caso, sólo se diferenciaron en el grado de dulzor el yogur control de aquel elaborado con la mayor dosis de enzima, siendo más dulce este último. Nagaraj y col. (2009), también utilizaron la tecnología de pre-incubación de la leche con la enzima hasta 50, 70 y 90% de hidrólisis. El análisis sensorial realizado por 5 evaluadores entrenados, señaló que los yogures con 50 y 70% de leche hidrolizada tuvieron mejores características de cuerpo y textura, y flavor, mientras que el de 90% tuvo un cuerpo y textura más débil y deficiente flavor, comparados con el control. Además, evaluaron la aceptabilidad global, el producto que presentó mayor aceptación fue el elaborado con 70% de hidrólisis mientras que el de mayor porcentaje de hidrólisis tuvo menor aceptación en comparación al yogur tradicional. La mayor

aceptación del yogur con 70% de hidrólisis, fue atribuido a la mayor disponibilidad de glucosa para la producción de compuestos de flavor, mientras que el deficiente flavor del yogur con 90% de hidrólisis pudo ser debido al sabor dulce muy intenso y un sabor residual amargo por la producción de péptidos amargos a causa de la elevada dosis de enzima. Similares resultados fueron también reportados por Ibarra y col. (2012). En efecto, con un panel de 15 evaluadores entrenados determinaron que la calidad sensorial global disminuyó a medida que el nivel de hidrólisis de lactosa aumentó. Los yogures con un contenido de lactosa muy bajo y altos recuentos de *L. rhamnosus* tuvieron una textura grumosa y difirieron significativamente en la viscosidad y la cohesión en comparación al yogur tradicional. No encontraron diferencias en lo que respecta al color y el aroma. También observaron que el aumento en la hidrólisis de lactosa produce un mayor crecimiento de la bacteria probiótica y un aumento en el tiempo de fermentación. La hipótesis que plantean es que el crecimiento excesivo de *L. rhamnosus* disminuye la calidad sensorial del yogur. Este aspecto también fue señalado por Olson y Aryana (2008), quienes encontraron que altos niveles de *Lactobacillus* influyen negativamente en la calidad. Finalmente, en dicho estudio concluyeron que a pesar de los resultados, el yogur es aceptable para su comercialización.

Varios trabajos reportan el efecto que ocasionan los prebióticos y probióticos sobre las propiedades sensoriales en yogures tradicionales. En este sentido Hekmat y Reid (2006) no encontraron diferencias en cuanto a la apariencia, flavor y textura de yogures con 1% de materia grasa, conteniendo sólo probióticos (*L. ruteri* y *L. rhamnosus*) y con dichos probióticos y prebióticos (inulina 0,40%; extracto de levadura 0,33%); pero la apariencia y la textura fueron ligeramente superiores en el yogur sin prob/preb comparado al que contenía prob/preb. Guven y col. (2005) empleando 7 evaluadores entrenados, encontraron que el incremento de inulina desde 1% a 3% en yogures bajos en grasa (0,1%) afectó negativamente el color y apariencia, sabor y aroma y aceptabilidad general en comparación al yogur entero (3,1%) sin inulina (control). En particular, los yogures con 1% de inulina fueron los que menos se diferenciaron del control. En cuanto al cuerpo y textura, no lograron detectar diferencias entre los diferentes yogures analizados. Por otro lado, Mazloomi y col. (2011) empleando un panel de 15 panelistas no entrenados, no encontraron diferencias significativas en los atributos de flavor, color, textura y sensación en la boca para yogures prebióticos con adición de diferentes niveles de inulina (1 y 2%) y yogures con inulina y la bacteria probióticos *L. acidophilus* La-5, con respecto al yogur sin estos agregados.

## IV.5 Conclusiones

En el presente Capítulo se validaron en elaboraciones de yogur a escala piloto (30 y 100 L) e industrial (4000 L) las estrategias estudiadas anteriormente a menor escala: adición de enzima  $\beta$ -galactosidasa y de ingredientes de origen lácteo tales como LPD y WPC, y agregado de inulina en los casos que se incorporó el probiótico *Lactobacillus acidophilus* La-5, de manera de obtener yogures deslactosados con diferentes características. Se evaluó el efecto de las modificaciones introducidas en la tecnología habitual de yogur sobre la formación de compuestos de aroma y el perfil sensorial por un panel entrenado, como así también sobre los perfiles de ácidos orgánicos y de azúcares y acidez, sinéresis y composición química global. Se analizó finalmente el impacto que el yogur deslactosado produce entre los consumidores.

En general, no se observaron importantes diferencias con los yogures obtenidos a escala laboratorio cuyos resultados se presentan en los Capítulos precedentes. La evolución de la acidez, del perfil de ácidos orgánicos y sinéresis, y la composición en los yogures deslactosados fueron similares al yogur tradicional. El contenido de lactosa residual en los yogures deslactosados fue inferior a 1,5 g/100 g, alcanzando valores muy bajos de hasta 0,6 g/100 g dependiendo de la variedad. De acuerdo al Código Alimentario Argentino (CAAb, 2010) este producto se denominaría “yogur reducido en lactosa”. Estos productos también estaban enriquecidos en GOS, con niveles que se ubicaron entre 0,6 – 0,8 g/100 g. El cultivo probiótico se mantuvo en niveles de  $10^7$  UFC/g, resultado adecuado para alimentos con adición de probióticos.

El perfil de compuestos volátiles se modificó sustancialmente durante la fermentación para todos los yogures, siendo los compuestos pertenecientes al grupo de las cetonas y los ácidos los predominantes al final de dicho proceso. Algunas diferencias en los clásicos compuestos que caracterizan la fracción volátil de yogur fueron detectadas: acetaldehído, diacetilo, acetoína y ácidos acético, butírico y hexanoico. Las principales diferencias se encontraron para el yogur deslactosado con adición de probiótico/prebiótico en comparación a los restantes yogures.

Los yogures deslactosados presentaron sabor a leche, gusto dulce más intenso y menor acidez que el yogur tradicional. No se evidenciaron diferencias en las características de textura, se trata de muestras poco consistentes, muy cremosas y con muy poca aspereza. El ensayo de aceptabilidad indicó que el 80% de los consumidores consultados prefirieron los yogures deslactosados; la mayor aceptabilidad estuvo vinculada a la menor acidez y mayor dulzor. Sin embargo, al disminuir el contenido de sacarosa en la leche de partida de los

yogures deslactosados se consiguió obtener productos con similar dulzor y aceptabilidad comparados a los tradicionales.

---

# CONCLUSIONES

---

La intolerancia a la lactosa es un problema de gran impacto en la población de América Latina. En el mercado argentino, son muy escasos los productos lácteos modificados en su contenido de lactosa, en particular, leches fermentadas y yogur con esta característica no están disponibles al alcance del consumidor. Por esta razón, los aportes tendientes a estudiar en profundidad el proceso enzimático de hidrólisis de la lactosa durante la elaboración de yogur y su impacto en el proceso fermentativo y durante la conservación resultan de relevancia.

La estrategia seleccionada consistió en el empleo de una enzima  $\beta$ -galactosidasa grado alimenticio proveniente de la levadura *Kluyveromyces lactis* (GODO, 50000 U/L) que se adicionó en diferentes niveles (0,16 – 0,40 g/L) junto con el starter a la leche/mezcla de partida. Se realizaron modificaciones de la matriz que consistieron en trabajar con leches de diferente contenido de materia grasa a la que se le incorporaron ingredientes lácteos como leche en polvo descremada y concentrado de proteínas de suero, fuentes principalmente de proteínas pero también de lactosa, como así también sacarosa, inulina, pectina y aspartamo, y se empleó un cultivo probiótico, de manera de obtener yogures con contenidos reducidos en lactosa en comparación a los productos tradicionales, de diferentes variedades y que posean propiedades funcionales.

La actividad metabólica del fermento no se vio sustancialmente modificada por el proceso de hidrólisis de lactosa a cargo de la enzima exógena, que se llevó a cabo en forma simultánea. Es decir que las profundas modificaciones en el perfil de carbohidratos (disminución del contenido de lactosa y aumento en las concentraciones de glucosa y galactosa) no impactaron en la formación/catabolismo de los ácidos orgánicos característicos de una fermentación ácido-láctica. Los porcentajes de hidrólisis de lactosa logrados en los productos deslactosados estuvieron siempre por encima de 70% alcanzando niveles de hasta 93%, dependiendo de la dosis de enzima empleada y de la variedad de yogur del cual se trate. Estos resultados se correlacionan con concentraciones residuales de lactosa en los yogures frescos entre 0,5 y 1,5 g/100 g, correspondiendo los menores valores a los productos tipo bebida y los mayores para los tipo batido debido al mayor contenido de lactosa de la mezcla de partida. Durante el almacenamiento refrigerado de los productos por 28 días a 5 °C, se evidenciaron ligeras disminuciones de estos niveles, lo que se atribuye únicamente a la actividad metabólica de la microbiota presente en la matriz, bacterias lácticas termófilas del fermento y cultivo probiótico según corresponda, ya que la enzima exógena se encuentra inactiva en las condiciones ácidas del medio imperante. Un



hecho importante que se apreció durante el proceso de elaboración de los yogures hidrolizados fue la formación de niveles apreciables de compuestos con actividad biológica como los galacto-oligosacáridos. Los mismos se generaron por la actividad secundaria de transgalactosilación que demostró poseer la enzima empleada, la cual se vio favorecida por las condiciones del medio.

La postacidificación, parámetro importante que limita la vida útil de yogur, y en algunos casos el contenido de ácido láctico, fue menor en los yogures deslactosados en comparación a los yogures tradicionales. La liberación espontánea de suero por parte de la matriz láctea (sinéresis) fue similar en ambos productos; la composición química global de los mismos también fue comparable.

Los perfiles de compuestos volátiles evidenciaron algunas diferencias principalmente para los yogures deslactosados con adición del probiótico.

Los yogures deslactosados presentaron sabor a leche, gusto dulce más intenso y menor acidez que el yogur tradicional. No se evidenciaron diferencias en las características de textura, los productos se caracterizaron por ser muy cremosos y con poca aspereza, aunque no muy consistentes. El ensayo de aceptabilidad indicó que el 80% de los consumidores consultados prefirieron los yogures deslactosados; la mayor aceptabilidad estuvo vinculada a la menor acidez y mayor dulzor. Sin embargo, al disminuir el contenido de sacarosa en la leche de partida de los yogures deslactosados se consiguió obtener productos con similar dulzor y aceptabilidad comparados a los tradicionales.

El hecho que la hidrólisis y fermentación de la lactosa se pudieron efectuar en forma simultánea y de una manera adecuada, resulta de vital relevancia desde el punto de vista industrial, ya que no se modificarían los tiempos de proceso habituales de la elaboración del yogur. Asimismo, el empleo de menor nivel de sacarosa de manera de evitar yogures muy dulces por la presencia de altos niveles de glucosa y galactosa, ayudaría a equilibrar el incremento de costos por el uso de la enzima exógena en comparación a la tecnología convencional de yogur.

Por los satisfactorios resultados logrados en este trabajo de tesis se considera que yogures con estas características: reducidos en la concentración de lactosa y con la presencia de bacterias probióticas como así también de compuestos bioactivos, principalmente destinados a individuos con dificultad para digerir la lactosa y con propiedades funcionales incrementadas, serían factibles de obtener a escala industrial. Productos de este tipo están ausentes en el mercado local y debido a las tendencias

crecientes en el consumo y producción de yogur en los últimos años, existiría un potencial mercado que no ha sido satisfecho hasta el presente.

---

REFERENCIAS  
BIBLIOGRÁFICAS

---

Østlie, H.; Helland, M.; Narvhus, J. (2003). Growth and metabolism of selected strains of probiotic bacteria in milk. *International Journal of Food Microbiology*, 87: 17-27.

Adhikari, K.; Grün, I. U.; Mustapha, A.; Fernando L. N. (2002). Changes in the profile of organic acids in plain set and stirred yogurt during manufacture and refrigerated storage. *Journal of Food Quality*, 25: 435-451.

Adolfsson, O.; Nikbin Meydani, S.; Russell, R. (2004). Yogurt and gut function. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80: 245-256.

Alm, L. (2003). Lactose Intolerance. En *Encyclopedia of Dairy Science*. Vol. 3. (Eds.: Roginski, H.; Fuquay, J.; Fox, P). Academic Press, London, pág. 1533-1539.

Alonso, L.; Fraga, M. (2001). Simple and rapid analysis for quantitation of the most important volatile flavor compounds in yogurt by headspace gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatographic Science*, 39: 297-300.

Amatayakul, T.; Sherkat, F.; Shah, N. P. (2006). Syneresis in set yogurt as affected by EPS starter cultures and levels of solids. *International Journal of Dairy Technology*, 59: 216-221.

Amoroso, M. J.; Manca de Nadra, M. C.; Oliver, G. (1989). The growth and sugar utilization by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* isolated from market yogurt. *Lait*, 69: 519-528.

Angelov, M.; Rostov, G.; Simova, E.; Beshkova, D.; Koprinkova-Hristova, P. (2009). Proto-cooperation factor in yogurt starter culture. *Revue de Génie Industriel*, 3: 4-12.

Bargeman, G. (2003). Separation technologies to produce dairy ingredients. En: *Dairy processing. Improving Quality*. (Ed.: Smit, G.). CRC Press, England, pág. 366-387.

Batista, A. L.; Silva, R.; Da Cruz, A. G.; Faria, J. A. F.; Moura, M. R. L.; Carvalho, L. M. J. (2008). Lactose intolerance: possibility of ingesting fermented dairy products. *Milchwissenschaft*, 63: 364-366.

Beshkova, D.; Simova, E.; Frengova, G.; Zimov, Z. (1998). Production of flavour compounds by yogurt starter cultures. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 20: 180-186.

Bills, D. D.; Yang, C. S.; Morgan, M. E.; Bodyfelt, F. W. (1972). Effect of sucrose on the production of acetaldehyde and acids by yogurt culture bacteria. *Journal of Dairy Science*, 55: 1570-1573.

Birollo, G. A.; Reinheimer, J. A.; Vinderola, C. G. (2000). Viability of lactic acid microflora in different types of yoghurt. *Food Research International*, 33: 799-805.

Bradley, R.; Arnold, E.; Barbano, D.; Semerad, R.; Smith, D. y Vines, B. (1992). Standard methods for the examination of dairy products. Chemical and physical methods. (Ed: Marshall, R.). American Public Health Association (APHA), Washington, USA, pág. 433-532.

Brand, J.; Holt, S. (1991). Relative effectiveness of milks with reduced amounts of lactose in alleviating milk intolerance. *American Journal of Clinical Nutrition*, 54: 148-151.

Bury, D.; Jelen, P.; Kaláb, M. (2001). Disruption of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 11842 cells for lactose hydrolysis in dairy products: a comparison of sonication, high-pressure homogenization and bead milling. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2: 23-29.

CAAa. Código Alimentario Argentino. Cap. VIII: Alimentos lácteos, Art. 576. (2010). [www.anmat.gov.ar/alimentos/normativas\\_alimentos\\_caa.asp](http://www.anmat.gov.ar/alimentos/normativas_alimentos_caa.asp).

CAAb. Código Alimentario Argentino. Cap. XVII: Alimentos de régimen o dietéticos, Art. 1372. (2013). [www.anmat.gov.ar/alimentos/normativas\\_alimentos\\_caa.asp](http://www.anmat.gov.ar/alimentos/normativas_alimentos_caa.asp).

CAAc. Código Alimentario Argentino. Cap. XVII: Alimentos de régimen o dietéticos, Art. 1376. (2013). [www.anmat.gov.ar/alimentos/normativas\\_alimentos\\_caa.asp](http://www.anmat.gov.ar/alimentos/normativas_alimentos_caa.asp).

CAAd. Código Alimentario Argentino. Cap. XVII: Alimentos de régimen o dietéticos, Art. 1389. (2013). [www.anmat.gov.ar/alimentos/normativas\\_alimentos\\_caa.asp](http://www.anmat.gov.ar/alimentos/normativas_alimentos_caa.asp).

Cardelle-Cobas, A.; Martínez-Villalunga, C.; Sanz, M.; Montilla, A. (2009). Gas chromatographic-mass spectrometric análisis of galactosyl derivates obtained by the action of two different  $\beta$ -galactosidasas. *Food Chemistry*, 114: 1099-1105.

Chandan R. C.; O'Rell K. R. (2006a). Cap. 15: Yogurt plant: Quality assurance. En: Manufacturing yogurt and fermented milks. (Ed.: Chandan, R. C.). Blackwell Publishing, USA, pág 247-264.

Chandan, R. C.; O'Rell, K. R. (2006b). Cap. 11: Ingredients for yogurt manufacture. En: Manufacturing yogurt and fermented milks. (Ed.: Chandan, R. C.). Blackwell Publishing, USA, pág. 179-193.

Cheng, H. (2010). Volatile flavor compounds in yogurt: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50: 938-950.

Chick, H.; Shin, H. S.; Ustunol, Z. (2001). Growth and acid production by lactic acid bacteria and bifidobacteria grown in skim milk containing honey. *Journal of Food Science*, 66: 478-481.

Chockchaisawasdee, S.; Athanasopoulos, V.; Niranjana, K.; Rastall, R. (2005). Synthesis of galacto-oligosaccharide from lactose using  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*: studies on batch and continuous UF membrane-fitted bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 89 (4): 434-443.

Chryssanthopoulos, C.; Maridaki, M. (2010). Nutritional aspects of yogurt and functional dairy products. En: Development and manufacture of yogurt and other functional dairy products. (Ed.: Yildiz, F.). CRC Press, USA, pág. 267-305.

CIL: Centro de la Industria Lechera. (2013). [www.cil.org.ar](http://www.cil.org.ar)

Conzuelo, F.; Gamella, M.; Campuzano, S.; Ruiz, M. A.; Reviejo, A. J.; Pingarrón, J. M. (2010). An integrated amperometric biosensor for the determination of lactose in milk and dairy products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 7141-7148.

Cruz, A. G.; Castro, W. F.; Faria, J. A. F.; Bolini, H. M. A.; Celeghini, R. M. S.; Raices, R. S. L.; Oliveira, C. A. F.; Freita, M. Q.; Conte Júnior, C. A.; Mársico, E. T. (2013). Stability of probiotic yogurt added with glucose oxidase in plastic materials with different permeability oxygen rates during the refrigerated storage. *Food Research International*, 51: 723–728.

Cruz, A. G.; Castro, W. F.; Faria, J. A. F.; Jr, S. B.; Granato, D.; Celeguini, R. M. S.; Lima-Pallone, J.; Godoy, H. (2012a). Glucose oxidase: a potential option to decrease the oxidative stress in stirred probiotic yogurt. *Food Science and Technology*, 47: 512-515.

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. (2012b). Probiotic yogurts manufactured with increased glucose oxidase levels: Postacidification, proteolytic patterns, survival of probiotic microorganisms, production of organic acid and aroma compounds. *Journal of Dairy Science*, 95: 2261-2269.

De la Fuente, M. A.; Montes, F.; Guerrero, G.; Juárez, M. (2003). Total and soluble contents of calcium, magnesium, phosphorus and zinc in yoghurts. *Food Chemistry*, 80: 573-578.

De Vrese, M.; Stegelmann, A.; Richter, B.; Fenselau, S.; Laue, C.; Schrezenmeir, J. (2001). Probiotics-compensation for lactase insufficiency. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73: 421-429.

Dekker, P. J. T.; Daamen, C. B. G. (2011). Enzymes exogenous to milk in dairy technology.  $\beta$ -D-Galactosidase. En: Encyclopedia of Dairy Science. Vol. 2. (Ed.: Fuquay, J. W.; Fox, P. F.; McSweeney P. L. H.). Academic Press, London, pág. 276-283.

Delisle, J.; Amiot, J.; Doré, F. (1995). Biological availability of calcium and magnesium from dairy products. *International Dairy Journal*, 5: 87-96.

Dello Staffolo, M.; Bertola, N.; Martino, M.; Bevilacqua, A. (2004). Influence of dietary fiber addition on sensory and rheological properties of yogurt. *International Dairy Journal*, 14: 263-268.

Donkor, O. N.; Henriksson, A.; Vasiljevic, T.; Shah, N. P. (2006). Effect of acidification on the activity of probiotic in yoghurt during cold storage. *International Dairy Journal*, 16: 1181-1189.

Drouault, S.; Anba, J.; Corthier, G. (2002). *Streptococcus thermophilus* is able to produce a  $\beta$ -Galactosidase active during its transit in the digestive tract of germ-free mice. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 938-941.

EFSA. (2010). Scientific Opinion on lactose thresholds in lactose intolerance and galactosaemia. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). *EFSA Journal* 8 (9): 1777, 1-29.

Ekinci, F. Y.; Gurel, M. (2008). Effect of using propionic bacteria as an adjunct culture in yogurt production. *American Dairy Science Association*, 9: 892-899.

Fernandes, P. (2010). Enzymes in food processing: A condensed overview on strategies for better biocatalyst. *Enzyme Research*, 10: 1-19.

Fernandez-Garcia, E.; McGregor, J. U. (1994). Determination of organic acids during fermentation and cold storage of yogurt. *Journal of Dairy Science*, 77: 2934-2939.

FIL-IDF 151: 2005. Yogurt - Determination of total solids contents (Reference Method).

FIL-IDF 198: 2007. Milk and Milk products. Determination of lactose content by high-performance liquid chromatography (Reference Method).

FIL-IDF 20-1: 2001. Milk- Determination of nitrogen content. Part 1: Kjeldahl method.

FIL-IDF 21B: 1987. Milk, cream and evaporated milk. Determination of total solids content (Reference Method).

Fox, P. F. (2009). Lactose: Chemistry and properties. En: *Advances Dairy Chemistry*. Vol. 3. Lactose, water, salts and minor constituents. 3rd ed. (Eds.: McSweeney, P. L. H.; Fox, P. F.). Springer, United States, pág. 1-13.

Frank, J. F.; Christen, G. L.; Morgan, S.; Lynch, C. M.; Niland, E. J.; Tobin, J. (1993). *Standar methods for the examination of dairy products*. Cap. 8: Tests for groups of microorganisms. (Ed: Marshall, R. T.). American Public Health Association (APHA). Washintong, Estados Unidos, pág. 271-286.

- Friedrich, J.; Acree, T. (1998). Gas chromatography olfactometry (GC/O) of dairy products. *International Dairy Journal*, 8: 235-241.
- Gaafar, A. (1992). Volatile flavour compounds of yoghurt. *International Journal of Food Science and Technology*, 27: 87-91.
- González de Llano, D.; Rodríguez, A.; Cuesta, P. (1996). Effect of lactic starter cultures on the organic acid composition of milk and cheese during ripening-analysis by HPLC. *Journal of Applied Bacteriology*, 80: 570-576.
- Gosling, A.; Alfrén, J.; Stevens, G.; Barber, A.; Kentish, S.; Gras S. (2009), Facile pretreatment of *Bacillus circulans*  $\beta$ -galactosidase increases the yield of galactosyl oligosaccharides in milk and lactose reaction systems. *Journal Agriculture Food Chemistry* 57: 11570-11574.
- Gosling, A.; Stevens, G.; Barber, A.; Kentish, S.; Gras, S. (2010). Recent advances refining galactooligosaccharides production from lactose. *Food Chemistry*, 121: 307-318.
- Grosová, Z.; Rosenberg, M.; Rebroš, M. (2008). Perspectives and Applications of immobilized  $\beta$ -Galactosidase in food industry – a review. *Czech Journal of Food Sciences*, 26: 1-14.
- Güler, Z. (2007). Changes in salted yoghurt during storage. *International Journal of Food Science and Technology*, 42: 235-245.
- Güler, Z.; Park, Y. W. (2011). Characteristics of physico-chemical properties, volatile compounds and free fatty acid profiles of commercial set-type Turkish yoghurts. *Open Journal of Animal Sciences*, 1: 1-9.
- Güler, Z.; Tasdelen, A.; Senol, H.; Kerimoğlu, N.; Temel, U. (2009). The determination of volatile compounds in set-type yogurts using static headspace gas chromatographic method. *GIDA*, 34: 137-142.
- Gürakan, C. G.; Altay, N. (2010). Probiotic dairy beverages: microbiology and technology. En: Development and manufacture of yogurt and other functional dairy products. (Ed.: Yildiz, F.). CRC Press, USA, pág. 165-195.
- Güven, M.; Yasar, K.; Karaca, O. B.; Hayaloglu, A. A. (2005). The effect of inulin as a fat replacer on the quality of set-type low-fat yogurt manufacture. *International Journal of Dairy Technology*, 58: 180-184.
- Güzel-Seydim, Z. B.; Seydim, A. C.; Greene, A. K.; Bodine, A. B. (2000). Determination of organic acids and volatile flavor substances in kefir during fermentation. *Journal of Food Composition and Analysis*, 13: 35-43.



Haggerty, R. J.; Luedecke, L. O.; Nagel, C. W.; Massey, L. K. (1984). Effect of selected yogurt cultures on the concentration of orotic acid, uric acid and A Hydroxymethylglutaric-Like compound in milk after fermentation. *Journal of Food Science*, 49: 1194-1195.

Haider, T.; Husain, Q. (2009). Hydrolysis of milk/whey lactose by  $\beta$ -galactosidase: a comparative study of stirred batch process and packed bed reactor prepared with calcium alginate entrapped enzyme. *Chemical Engineering and Processing*, 48: 576-580.

Harju, M. IDF Symposium lactose & its derivatives. Moscow, 2007.

Harju, M.; Kallioinen, H.; Tossavainen, O. (2012). Lactose hydrolysis and other conversions in dairy products: Technological aspects. *International Dairy Journal*, 22: 104-109.

Hekmat, S.; Reid, G. (2006). Sensory properties of probiotic yogurt is comparable to standard yogurt. *Nutrition Research*, 26: 163-166.

Heller, K. J. (2001). Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73: 374S-379S.

Hernández, A.; Vélez Ruiz, J. F. (2010). Efecto de la reducción y eliminación de lactosa en las propiedades de yogur. XII Congreso nacional de ciencia y tecnología de alimentos. Universidad de Guanajuato.

Hertzler, S.; Clancy, S. (2003). Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. *Journal of the American Dietetic Association*, 103: 582-587.

Heyman, M. (2006). Lactose intolerance in infants, children, and adolescents. *Pediatrics*, 118: 1279-1286.

Hickey, M. W.; Hillier, A. J.; Jago, G. R. (1986). Transport and metabolism of lactose, glucose, and galactose in homofermentative lactobacilli. *Applied and Environmental Microbiology*, 51: 825-831.

Horner, T. W.; Dunn, M. L.; Eggett, D. L.; Ogden, L. V. (2011).  $\beta$ -Galactosidase activity of commercial lactase samples in raw and pasteurized milk at refrigerated temperatures. *Journal of Dairy Science*, 94 (7): 3242-3249.

Ibarra, A.; Acha, R.; Calleja, M.-T.; Chiralt-Boix, A.; Wittig, E. (2012). Optimization and shelf life of a low-lactose yogurt with *Lactobacillus rhamnosus* HN001. *Journal of Dairy Science*, 95: 3536-3548.

Ibeagha-Awemu, E. M.; Liu, J.-R.; Zhao, X. (2010). Bioactive components in yogurt products. En: Bioactive components in milk and dairy products. (Ed.: Park, Y. W.). Wiley-Blackwell, Singapore, pág. 235-250.

Imhof, R.; Bosset, J. (1994). Quantitative GC-MS analysis of volatile flavour compounds in pasteurized milk and fermented milk products applying a standard addition method. *Lebensmittel Wissenschaft und-Technologie*, 27: 265-269.

Imhof, R.; Glättli, H.; Bosset, J. (1994). Volatile organic aroma compounds produced by thermophilic and mesophilic mixed strain dairy starter cultures. *Lebensmittel Wissenschaft und-Technologie*, 27: 442-449.

Imhof, R.; Glättli, H.; Bosset, J. (1995). Volatile organic compounds produced by thermophilic and mesophilic single strain dairy starter cultures. *Lebensmittel Wissenschaft und-Technologie*, 28: 78-86.

Ingnoli, M. S. (2013). Tesina de Licenciatura en Química en el tema “Análisis de galacto-oligosacáridos (GOS) en productos lácteos. Estrategias tecnológicas para favorecer su producción en yogur”. INLAIN/FIQ.

Ingram, C. J. E.; Swallow, D. M. (2009). Lactose malabsorption. En: *Advances Dairy Chemistry*. Vol. 3: Lactose, water, salts and minor constituents, 3<sup>er</sup> ed. (Eds.: McSweeney, P. L. H.; Fox, P. F.). Springer, United States, pág. 203-222.

Ismail, A. A.; Mogensen, G.; Poulsen, P. R. (1983). Organoleptic and physical properties of yogurt made from lactose hydrolyzed milk. *Journal of the Society of Dairy Technology*, 36: 52-55.

ISO 11869/IDF 150: 2012. Fermented milks - Determination of titratable acidity – Potenciometric method.

ISO-8589. (1988). Sensory analysis – general guidance for the design of test rooms. International Standard 8589, [Ref. No. ISO 8589:1988 (E)]. Geneva, Switzerland, International Organization for Standardization.

Jelen, P.; Tossavainen, O. (2003). Low lactose and lactose-free milk and dairy products – prospects, technologies and applications. *Australian Journal of Dairy Technology*, 58: 161-165.

Kailasapathy, K. (2006). Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. *Food Science and Technology*, 39: 1221-1227.

Kaminarides, S; Stamou, P.; Massouras, T. (2007). Comparison of the characteristics of set type yoghurt made from ovine milk of different fat content. *International Journal of Food Science and Technology*, 42: 1019-1028.

Kim, S.; Lim, C.; Lee, C.; An, G. (2009). Optimization of growth and storage conditions for lactic acid bacteria in yogurt and frozen yogurt. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 52: 76-79.

Kim, S.; Lim, K.; Kim, H. (1997). Differences in the hydrolysis of lactose and other substrates by  $\beta$ -D-galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Journal of Dairy Science*, 80: 2264-2269.

Kip, P., Meyer, D.; Jellema, R. H. (2006). Inulins improve sensoric and textural properties of low-fat yoghurts. *International Dairy Journal*, 16: 1098-1103.

Klein, M. P.; Fallavena, L. P.; Schoffer, J.; Ayub, M.; Rodrigues, R. C.; Ninow, J. L.; Hertz, P. F. (2013). High stability of immobilized  $\beta$ -D-galactosidase for lactose hydrolysis and galactooligosaccharides synthesis. *Carbohydrate Polymers*, 95: 465-470.

Korhonen, H. (2009). Milk-derived bioactive peptides: from science to application. *Journal of Functional Foods*, 1: 177-187.

Korhonen, H. (2010). Bioactive components in bovine milk. En: Bioactive components in milk and dairy products. (Ed.: Park, Y.). Wiley-Blackwell, Singapore, pág. 15-42.

Kosikowski, F. (1979). Low lactose yogurts and milk beverages by ultrafiltration. *Journal of Dairy Science*, 62: 41-46.

Kreft, M.; Roth, L.; Jelen, P. (2001). Lactose hydrolyzing ability of sonicated cultures of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 11842. *Lait*, 81: 355-364.

Kunz, C.; Rudloff, S. (2006). Health promoting aspects of milk oligosaccharides. *International Dairy Journal*, 16: 1341-1346.

La Torre, L.; Tamime, A. Y.; Muir, D. D. (2003). Rheology and sensory profiling of set-type fermented milks made with different commercial probiotic and yoghurt starter cultures. *International Journal of Dairy Technology*, 56: 163-170.

Lamoureux, L.; Roy, D.; Gauthier, S. (2002). Production of oligosaccharides in yogurt containing bifidobacteria and yogurt cultures. *Journal of Dairy Science*, 85: 1058-1069.

Larson, B. L.; Hegarty, H. M. (1979). Orotic acid in milks of various species and commercial dairy products. *Journal Dairy Science*, 62: 1641-1644.

Law, B. (1981). The formation of aroma and flavour compounds in fermented dairy products. *Dairy Science Abstracts*, 43: 143-154.

Laye, I.; Karleskind, D.; Morr, C. (1993). Chemical, microbiological and sensory properties of plain nonfat yogurt. *Journal of Food Science*, 58: 991-995.

Lazzarino, G. (2013). Pasantía de investigación en el tema "Análisis de los perfiles de compuestos volátiles en yogur deslactosado" INLAIN.

Lee, W. J.; Lucey J. A. (2010). Formation and physical properties of yogurt. *Asian - Australasian Journal of Animal Sciences*, 23: 1127-1136.

Limsawat, P.; Pruksasri, S. (2010). Separation of lactose from milk by ultrafiltration. *Asian Journal of Food and Agro-Industry*, 3: 236-243.

Liu, S-Q. (2003). Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 83: 115-131.

Lourens-Hattingh, A.; Viljoen, B. C. (2001). Yogurt as probiotic carrier food. Review. *International Dairy Journal*, 11: 1-17.

Lucas, A.; Sodini, I.; Monnet, C.; Jolivet, P.; Corrieu, G. (2004). Probiotic cell counts and acidification in fermented milks supplemented with milk protein hydrolysates. *International Dairy Journal*, 14: 47-53.

Madrigal, L.; Sangronis, E. (2007). La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 57: 387-396.

Mahdian, E.; Tehrani, M. M. (2007). Evaluation the effect of milk total solids on the relationship between growth and activity of starter cultures and quality of concentrated yoghurt. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences*, 2 (5): 587-592.

Mahoney, R. (1998). Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: a review. *Food Chemistry*, 63: 147-54.

Mahoney, R. (2003). Enzymes exogenous to milk in dairy technology. Beta-D-Galactosidase. En: *Encyclopedia of Dairy Science*. (Eds.: Roginski, H.; Fuquay, J.; Fox, P.). Academic Press, London, pág. 907-926.

Marshall, R. T. (2006). Cap. 7: Laboratory analysis of fermented milks. En: *Manufacturing yogurt and fermented milks*. (Ed.: Chandan, R. C.). Blackwell publishing, USA, pág. 117-128.

Martínez-Villaluenga, C.; Cardelle-Cobas, A.; Corzo, N.; Olano, A.; Villamiel, M. (2008a). Optimization of conditions for galactooligosaccharide synthesis during lactose hydrolysis by  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* (Lactozym 3000 L HP G). *Food Chemistry*, 107: 258-264.

Martínez-Villaluenga, C.; Cardelle-Cobas, A.; Corzo, N.; Olano, A. (2008b). Study of galactooligosaccharide composition in commercial fermented milks. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21: 540-544.

Martínez-Villaluenga, C.; Frías, F.; Gómez, R.; Vidal-Valverde, C. (2006). Influence of addition of raffinose family oligosaccharides on probiotic survival in fermented milk during refrigerated storage. *International Dairy Journal*, 16: 768-774.

Martins, A. R.; Monteiro, R. L.; Fernandes de Medeiros, Burket, J.; Veiga Burket, C. A. (2012). Simultaneous enzymatic hydrolysis and lactic fermentation to obtain a yogurt with low lactose content. *Ciência e Agrotecnologia, Lavras*, 36: 551-559.

Mateo, C.; Monti, R.; Pessela, B. C. C.; Fuentes, M.; Torres, R.; Guisán, J. M.; Fernández-Lafuente, R. (2004). Immobilization of lactase from *Kluyveromyces lactis* greatly reduces the inhibition promoted by glucose. Full hydrolysis of lactose in milk. *Biotechnology Progress*, 20: 1259-1262.

Matioli, G.; Farias de Moraes, F.; Zanin, G. (2001). Hydrolysis of lactose by  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*: characterization of the enzyme. *Maringá*, 23 (3): 655-659.

Mazloomi, S. M.; Shekarforoush, S. S.; Edrahimnejad, H.; Sajedianfard, J. (2011). Effect of adding inulin on microbial and physicochemical properties of low fat probiotic yogurt. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 12: 93-98.

McComas, K. A., Gilliland, S. E. (2003). Growth of probiotic and traditional yogurt cultures in milk supplemented with whey protein hydrolysate. *Journal of Food Science*, 68: 2090-2095.

McKinley, M. (2005). The nutrition and health benefits of yogurt. *International Journal of Dairy Technology*, 58: 1-12.

Meilgaard, M. C.; Civille, G. V.; Carr, B. T. (2007). Sensory evaluation techniques. CRC Press. Boca Ratón, USA.

Melletin, J. (2012). New-Nutrition report: Lactose-free Dairy: Opportunities, strategies and key case studies.

Messia, M. C.; Candigliota, T.; Marconi, E. (2007). Assessment of quality and technological characterization of lactose-hydrolysed milk. *Food Chemistry*, 104: 910-917.

Mlichová, Z.; Rosenberg, M. (2006). Current trends of  $\beta$ -galactosidase application in food technology. *Journal of Food Nutrition Research*, 45: 47-54.

Mozzafar, Z.; Nakanishi, K.; Matsuno, F. (1985). Formation of oligosaccharides during hydrolysis of lactose in milk using  $\beta$ -galactosidase from *Bacillus circulans*. *Journal of Food Science*, 50: 1602-1606.

Mussatto, S.; Mancilha, I. (2007). Non-digestible oligosaccharides: A review. *Carbohydrate Polymers*, 68: 587-597.

Nagaraj, M.; Sharanagouda, B.; Manjunath, H.; Manafi, M. (2009). Standarization of different levels of lactose hydrolysis in the preparation of lactose hydrolyzed yoghurt. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 10: 132-136.

O'Leary, V. S.; Woychik, J. H. (1976). Utilization of lactose, glucose, and galactose by a mixed culture of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in milk treated with lactase enzyme. *Applied and Environmental Microbiology*, July: 89-94.

Oliveira, R. P. S.; Florence, A. C. R.; Silva, R. C.; Perego, P.; Converti, A.; Gioielli, L. A.; Oliveira, M. N. (2009). Effect of different prebiotics on the fermentation kinetics, probiotic survival and fatty acids profiles in nonfat symbiotic fermented milk. *International Journal of Food Microbiology*, 128: 467-472.

Oliveira, R. P. S.; Perego, P.; Oliveira, M. N.; Converti, A. (2012). Growth, organic acids profile and sugar metabolism of *Bifidobacterium lactis* in co-culture with *Streptococcus thermophilus*: The inulin effect. *Food Research International*, 48: 21-27.

Olson, D. W.; Aryana, K. J. (2008). An excessively high *Lactobacillus acidophilus* inoculation level in yogurt lowers product quality during storage. *Food Science and Technology*, 41: 911-918.

Ott, A.; Fay, L.; Chaintreau, A. (1997). Determination and origin of the aroma impact compounds of yogurt flavor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45: 850-858.

Ott, A.; Germond, J-E.; Baumgartner, M.; Chaintreau, A. (1999). Aroma comparisons of traditional and mild yogurts: headspace gas chromatography quantification of volatiles and origin of  $\alpha$ -diketones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 2379-2385.

Panesar, P. (2008). Application of response surface methodology in the permeabilization of yeast cells for lactose hydrolysis. *Biochemical Engineering Journal*, 39: 91-6.

Panesar, P.; Kumari, S.; Panesar, R. (2010). Review article: Potential applications of immobilized  $\beta$ -galactosidase in food processing industries. *Enzyme Research*, vol. 2010, Article ID 473137, 16 pages.

Park, A-R.; Oh, D-K. (2010). Galacto-oligosaccharide production using microbial  $\beta$ -galactosidase: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85: 1279-1286.

Playne, M. (2004). Galacto-oligosaccharides. En: Encyclopedia of Dairy Science. (Eds.: Roginski, H.; Fuquay, J.; Fox, P.). Academic Press, London. Pag.

Playne, M.; Crittenden, R. (2009). Galacto-oligosaccharides and other products derived. En: Advances dairy chemistry. Vol. 3. Lactose, water, salts and minor constituents. 3<sup>er</sup> ed. (Eds.: McSweeney, P.; Fox, P.). Springer, United States, pág. 121-188.

Pochart, P.; Dewit, O.; Desjeux, J. F.; Bourlioux, P. (1989). Viable starter culture,  $\beta$ -galactosidase activity, and lactose in duodenum after yogurt ingestion in lactase-deficient humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, 49: 828-831.

Prajapati, J.; Nair, B. (2008). The history of fermented foods. En: Handbook of fermented functional foods. 2<sup>da</sup> ed. (Ed.: Farnworth, E.). CRC Press, United States, pág. 1-24.

Repelius, C. (2001). Lactase: an optimum enzyme for low lactose dairy products. *Asia Pacific Food Industry*; June: 24-27.

Richmond, M.; Gray, J.; Stine, C. (1981). Beta-Galactosidase: Review of recent research related to technological application, nutritional concerns, and immobilization. *Journal of Dairy Science*, 64: 1759-1771.

Rinaldoni, N.; Campderrós, M.; Menéndez, C.; Padilla, A. (2005). Río de Janeiro, Brazil. Low lactose content yogurt by ultrafiltration of skim-milk. Proceeding of 2<sup>nd</sup> Mercosur Congress on Chemical Engineering, 4<sup>th</sup> Mercosur Congress on Process Systems Engineering.

Rizzello, C. G.; De Angelis, M. (2011). *Lactobacillus* spp.: *Lactobacillus delbrueckii* Group. En: Encyclopedia of Dairy Science. 2<sup>da</sup> ed. Vol. 3. (Ed.: Fuquay, J. W.; Fox, P. F.; McSweeney, P. L. H.). Academic Press, London, pág. 119 – 124.

Robinson, R. K. (2011). Yogurt: role of starter culture. En: Encyclopedia of Dairy Science. 2<sup>da</sup> ed. Vol. 2. (Ed.: Fuquay, J. W.; Fox, P. F.; McSweeney, P. L. H.). Academic Press, London, pág. 529-532.

Rodríguez, V. A.; Cravero, B. F.; Alonso, A. (2008). Proceso de elaboración de yogur deslactosado de leche de cabra. *Ciencia e Tecnología de Alimentos*, 28: 109-115.

Routray, W.; Mishra, H. N. (2011). Scientific and technical aspects of yogurt aroma and taste: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10: 208-220.

Saad, N.; Delattre, C.; Urdaci, M.; Schmitter, J. M.; Bressollier, P. (2013). An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *Food Science and Technology*, 50: 1-16.

SAGPyA: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos. (2013). [www.alimentosargentinos.gov.ar/lacteos](http://www.alimentosargentinos.gov.ar/lacteos).

Sako, T.; Matsumoto, K.; Tanaka, R. (1999). Recent progress on research and applications of non-digestible galacto-oligosaccharides. *International Dairy Journal*, 9: 69-80.

Salminen, S.; Kenifel, W.; Ouwehand, A. C. (2011). Probiotics, applications in dairy products En: Encyclopedia of Dairy Science. 2<sup>da</sup> ed. Vol. 2. (Ed.: Fuquay, J. W.; Fox, P. F.; McSweeney, P. L. H.). Academic Press, London, pág. 412-419.

Sanchez, C.; Suero, M.; Castignani, H.; Terán, J. C.; Marino, M. (2012). La lechería argentina: estado actual y su evolución (2008-2011). Trabajo presentado en el marco del Proyecto Específico “Gestión de la Información y Modelización en Lechería Bovina (52-071092). PAN Leches. INTA.

Saxelin, M.; Korpela, R.; Mäyrä-Mäkinen, A. (2003). Functional dairy products. En: Dairy processing. Improving quality. (Ed.: Smit, G.). CRC Press, Washington, pág. 229-245.

Schaafsma, G. (2003). Lactose/nutritional significance of lactose and lactose derivatives. En: Encyclopedia of Dairy Science. Vol. 3. (Eds.: Roginski, H.; Fuquay, J.; Fox, P.). Academic Press, London, pág. 1529-1533.

Schaafsma, G. (2008). Lactose and lactose derivatives as bioactive ingredients in human nutrition. *International Dairy Journal*, 18: 458-465.

Schlichtherle-Cerny; Oberholzer, D. (2007) Comparison of aroma compounds of mild and traditional acid yogurts using SPM-GC-O-MS. 5<sup>th</sup> Nizo Dairy Conference-Prospects for flavour formation and perception Papendal, June 13-15.

Shah, N. (2000). Effects of milk-derived bioactives: an overview. *British Journal of Nutrition*, 84 (1): S3-S10.

Shakeel-Ur-Rehman. (2009). Reduced lactose and lactose-free dairy products. En: Advances Dairy Chemistry. Vol. 3: Lactose, water, salts and minor constituents, 3<sup>er</sup> ed. (Eds.: McSweeney, P. L. H.; Fox, P. F.) Springer, United States, pág. 98-103.

Shaukat, A.; Levitt, M. D.; Taylor, B. C.; MacDonald, R.; Shamliyan, T. A.; Kane, R. L.; Wilt, T. J. (2010). Systematic review: Effective management strategies for lactose intolerance. *Annals of Internal Medicine*, 152: 797-803.

Sieber, R.; Bosset, J. O.; Bütikofer U. (1995). Benzoic acid as a natural compound in cultured dairy products and cheese. *International Dairy Journal*, 5: 227-246.

Singh, G.; Muthukumarappan, K. (2008). Influence of calcium fortification on sensory, physical and rheological characteristics of fruit yogurt. *Food Science and Technology*, 41: 1145-1152.

Slocum, S. A.; Jasinski, E. M.; Anantheswaran, R. C.; Kilara, A. (1987). Effect of sucrose on proteolysis in yogurt during incubation and storage. *Journal of Dairy Science*, 71: 589-595.



Smith, D.; Gross, K. (2000). A family of at least seven  $\beta$ -galactosidase genes is expressed during tomato fruit development. *Plant Physiology*, 123: 1173-1183.

Sobowale, A.; Ejuntoye, M.; Adesetan, O. (2011). Energy sources of yogurt bacteria and enhancement of their galactose uptake. *African Journal of Biotechnology*, 10: 4457-4463.

Sodini, I.; Lucas, A.; Oliveira, M. N.; Remeuf, F.; Corrieu, G. (2002). Effect of milk base and starter culture on acidification, texture, and probiotic cell count in ferment milk processing. *Journal of Dairy Science*, 85: 2479-2488.

Somkuti, G. A.; Dominiacki, M. E.; Steinberg, D. H. (1996). Sensitivity of *Streptococcus thermophilus* to chemical permeabilization. *Current Microbiology*, 32: 101-105.

Somkuti, G. A.; Dominiacki, M. E.; Steinberg, D. H. (1998). Permeabilization of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* with ethanol. *Current Microbiology*, 36: 202-206.

Somkuti, G. A.; Steinberg, D. H. (1995). Permeabilized *Streptococcus thermophilus* in the preparation of low-lactose milk. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 21: 23-29.

Song, Y.; Lee, J.; Kang, S.; Kim, S. (2010). Performance of  $\beta$ -galactosidase pretreated with lactose to prevent activity loss during the enzyme immobilization process. *Food Chemistry*, 123: 1-5.

Splechtna, B.; Nguyen, T-H.; Steinböck, M.; Kulbe, K.; Lorenz, W.; Haltrich, D. (2006). Production of prebiotic galacto-oligosaccharides from lactose using  $\beta$ -galactosidase from *Lactobacillus reuteri*. *Journal of Agricultura and Food Chemistry*, 54: 4999-5006.

Sun, S.; Li, X.; Nu, S.; You, X. (1999). Immobilization and Characterization of  $\beta$ -Galactosidase from the plant gram chicken bean (*cicer arietinum*). Evolution of its enzymatic actions in the hydrolysis of lactose. *Journal of Agricultura and Food Chemistry*, 47: 819-823.

Surono, I. S.; Ozono, A. (2011). Fermented milks: Types and standards of identity. En: *Encyclopedia of Dairy Science*. Vol. 2. (Eds.: Fuquay, J.; Fox, P.; McSweeney, P.). Academic Press, London, pág. 470-476.

Takano, T.; Yamamoto, N. (2011). Health effects of fermented milks. En: *Encyclopedia of Dairy Science*. Vol. 2. (Eds.: Fuquay, J.; Fox, P.; McSweeney, P.). Academic Press, London, pág. 483-488.

Tamime, A. (2002). Fermented milks: a historical food with modern applications – a review. *European Journal of Clinical Nutrition*, 56: S2-S15.

Tamime, A. Y.; Robinson R. K. (2007). Tamime and Robinson's Yoghurt, Science and Technology. 3<sup>ra</sup> ed. CRC Press, USA.

Tamime, A. Y.; Robinson, R. K. (1991). Yogur. Ciencia y tecnología. Acribia S. A. Zaragoza, España.

Tello-Solís, S.; Jiménez-Guzman, J.; Sarabia-Leos, C.; Gómez-Ruíz, L.; Cruz-Guerrero, A.; Rodríguez-Serrano, G.; García-Garabay, M. (2005). Determination of the secondary structure of *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galactosidase by circular dichroism and its structure-activity relationship as a function of the pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 10200-10204.

Toba, T.; Arihara, K.; Adachi, S. (1986). Quantitative changes in oligosaccharides during fermentation and storage of yogurt inoculated simultaneously with starter culture and  $\beta$ -galactosidase preparation. *Journal of Dairy Science*, 69: 1241-1245.

Toba, T.; Watanabe, A.; Adachi, S. (1982). Quantitative changes in sugars especially oligosaccharides, during fermentation and storage of yogurt. *Journal of Dairy Science*, 66: 17-20.

Toba, T.; Watanabe, A.; Adachi, S. (1983). Allolactose and 6-O- $\beta$ -D- Galactopyrasosyl-D-Galactose in commercial yogurt. *Journal of Dairy Science*, 65: 702-706.

Tormo, M., Izco, J. M. (2004). Alternative reversed-phase high-performance liquid chromatography method to analyse organic acids in dairy products. *Journal of Chromatography A*, 1033: 305-310.

Tossavainen, O.; Kallioinen, H. (2007a). Effect of lactose hydrolysis on furosine formation in skim milk during pasteurisation. *Milchwissenschaft*, 62 (2): 188-191.

Tossavainen, O.; Kallioinen, H. (2007b). Proteolytic changes in lactose hydrolysed UHT milks during storage. *Milchwissenschaft*, 62 (4): 410-414.

Trainotti, L.; Spinello, R.; Piovan, A.; Spolaore, S.; Casadoro, G. (2001).  $\beta$ -Galactosidases with a lectin-like domain are expressed in strawberry. *Journal of Experimental Botany*, 52: 1635-1645.

Trincone, A. (2011). Marine biocatalysts: Enzymatic features and applications. *Marine Drugs*, 9 (4): 478-499.

Tuure, T. (2007). Lactose Intolerance: From the origin to treatment, IDF Symposium Lactose & its derivatives, Moscow.

Upreti, P.; McKay, L. L.; Metzger, L. E. (2006). Influence of calcium and phosphorus, lactose, and SALT-to-moisture ratio on cheddar cheese quality: changes in residual sugars and water-soluble organic acids during ripening. *Journal of Dairy Science*, 89: 429-443.

Urbiene, S.; Leskauskaitė, D. (2006). Formation of some organic acids during fermentation of milk. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 15: 277-281.

Van de Water, J.; Naiyanetr, P. (2008). Yogurt and immunity. The health benefits of fermented milk products that contain lactic acid bacteria. En: Handbook of fermented functional foods. 2<sup>da</sup> ed. (Ed. Farnwoth, E.). CRC Press, United States, pág. 129-164.

Vandenplas, Y. (2002). Oligosaccharides in infant formula. *British Journal of Nutrition*, 87: S293-S6.

Vasiljevic, T.; Jelen, P. (2001). Production of  $\beta$ -galactosidase for lactose hydrolysis in milk and dairy products using thermophilic lactic acid bacteria. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2: 75-85.

Vasiljevic, T.; Jelen, P. (2002). Lactose hydrolysis in milk as affected by neutralizers used for the preparation of crude  $\beta$ -galactosidase extracts from *Lactobacillus bulgaricus* 11842. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 3: 175-184.

Vasiljevic, T.; Jelen, P. (2003). Oligosaccharide production and proteolysis during lactose hydrolysis using crude cellular extracts from lactic acid bacteria. *Lait*, 83: 453-467.

Vedamuthu, E. R. (2006). Cap. 6: Starter cultures for yogurt and fermented milks. En: Manufacturing yogurt and fermented milks. (Ed.: Chandan, R. C.). Blackwell Publishing, USA, pág. 89-115.

Vénica, C. I. (2009). Pasantía de investigación en el tema “Participación en el desarrollo de una tecnología para la elaboración de yogur reducido en lactosa”. INLAIN. Facultad de Ingeniería Química (UNL).

Vera, C.; Guerrero, C.; Conejeros, R.; Illanes, A. (2012). Synthesis of galacto-oligosaccharides by  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae* using partially dissolved and supersaturated solution of lactose. *Enzyme and Microbial Technology*, 50: 188-194.

Vesa, T.; Marteau, P.; Korpela, R. (2000). Lactose intolerance. *Journal of the American Collage and Nutrition*, 19: 165S-75S.

Vinderola, C. G.; Bailo, N.; Reinheimer, J. A. (2000). Survival of probiotic microflora in Argentinian yoghurts during refrigerated storage. *Food Research International*, 33: 97-102.

Walstra, P.; Geurst, T. J.; Noomen, A.; Jellema, A.; van Boekel, M. A. (1999). Dairy technology. Marcel Dekker, Inc. New York.

Whalen, C. A.; Gilmore, T. M.; Spurgeon, K. R.; Parsons, J. G. (1988). Yogurt manufactured from whey-caseinate blends and hydrolyzed lactose. *Journal Dairy Science*, 71: 299-305.

Wildman, R. (2001). Cap. 1: Nutraceuticals a brief review of historical and teleological aspects. En: Handbook Nutraceuticals and Funcional Foods. (Ed.: Wildman, R.). CRC Press, Washington, pág.

Wu, Z.; Burns, J. A. (2004).  $\beta$ -galactosidase gene is expressed during mature fruit abscission of 'Valencia' orange (*Citrus sinensis*). *Journal of Experimental Botany*, 55: 1483-1490.

Xanthopoulos, V.; Petridis, D.; Tzanetakis, N. (2001). Characterization and classification of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains isolated from traditional Greek yogurts. *Journal of Food Science*, 65: 747-752.

Zeppa, G.; Conterno, L.; Gerbi, V. (2001). Determination of organic acids, sugars, diacetyl, and acetoin in cheese by high-performance liquid chromatography. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49: 2722-2726.

Zhou, Q. Z. K.; Chen, X. D. (2001). Effects of temperature and pH on the catalytic activity of the immobilized  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Biochemical Engineering Journal*, 9: 33-40.

Zourari, A.; Accolas, J. P.; Desmazeaud, M. J. (1992). Metabolism and biochemical characteristics of yogurt bacteria. A review. *Lait*, 72: 1-34.